

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平2-503094

⑬ 公表 平成2年(1990)9月27日

⑭ Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分)	3(3)
C 08 B 37/00	Q	7019-4C				
A 61 K 7/00	J	8413-4C				
	K	8413-4C※				

(全 33 頁)

⑯ 発明の名称 アロエ製品の製造方法

⑰ 特 願 平1-502244

⑱ 国訳文提出日 平1(1989)9月14日

⑲ 出 願 平1(1989)1月12日

⑳ 国 際 出 願 PCT/US89/00038

㉑ 国際公開番号 WO89/06539

㉒ 国際公開日 平1(1989)7月27日

優先権主張 ㉓ 1988年1月14日 ㉔ 米国(US) ㉕ 144,872

⑳ 発 明 者 マツカナレイ ビル エツチ. アメリカ合衆国, テキサス 75052, グランドブレイリー チョーク コート 4602

㉖ 出 願 人 カーリントン ラボラトリーズ アメリカ合衆国, テキサス 75062, アービング, イースト ロッ
インコーポレーテッド シエル ボウルバード 1300

㉗ 代 理 人 弁理士 松井 光夫

㉘ 指 定 国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許), S U

最終頁に続く

請求の範囲

1. アロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法において:

- 可溶化物を有するアロエジュースを得ること;
- 前記アロエジュースのpHを約3.00〜約3.50に調整すること;
- アロエジュースに、水溶性低級脂肪族極性溶媒を添加して活性化学物質を析出させ、それにより不均一溶液を形成させること;
- 不均一溶液から、水溶性低級脂肪族極性溶媒および可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること; および
- 析出した活性化学物質を乾燥することを含む方法。

2. 前記アロエジュースが、

- アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して、実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること;
- 前記洗浄した葉から、少なくとも第1の端部を除去すること;
- 前記の切断し洗浄した葉からアントラキノンに富む液汁を排液し、保存し、濃縮すること;
- 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないゲルフィレットを製造すること; および
- 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエ ゲ

ル フィレットを挽きそして均質化して、実質的にアントラキノンを含まない、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

3. 前記アロエジュースが、

- アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること;
- 洗浄したアロエの葉を砕くこと; および
- 砕いた葉を造析して、砕いた葉の残存固分から実質的にアントラキノンを含まないゲルを化学的に取出し分離すること

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

4. 前記アロエジュースが、

- アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること;
- 洗浄したアロエの葉を砕くこと; および
- 前記砕いたアロエ葉を挽きそして均質化して、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

5. 前記アロエジュースが、

- アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して表面の汚れとバクテリアを実質的に除去すること;

- b) 前記洗浄したアロエの葉を挽くこと；
 c) 前記の挽いたアロエの葉を濾過して、繊維状物質を除去すること；および
 d) 前記の挽いたアロエの葉を均質化して、アントラキノンを含む、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること
- により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。
6. 前記アロエジュースが、
 a) アロエ植物の葉を砕いて、可溶化物を有するアロエジュースを押し出すこと
- により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。
7. 前記アロエジュースが、
 a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
 b) 前記葉から外皮を除去して、アロエゲルフィレットを製造すること；および
 c) 前記アロエゲルフィレットを挽きそして均質化して、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること
- により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。
8. 前記析出物が照射され、それによって前記活性化学物質が殺菌され、保存される請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

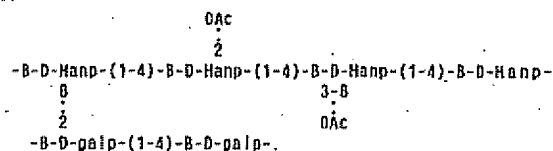
9. 前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒4体積を、アロエジュース1体積に添加して前記活性化学物質を析出させる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。
10. 前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒が、メタノール、エタノールおよびプロパノールからなる群より選ばれる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。
11. 前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒が、エタノールである請求項10記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。
12. 前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒が除去される前に、前記活性化学物質が前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒およびアロエジュースから約4時間析出せしめられる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。
13. 前記の析出した活性化学物質が、凍結乾燥により乾燥される請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。
14. f) 析出した活性化学物質をリン酸緩衝液に再溶解させること；
 g) 再溶解された、析出した活性化学物質を、非特異的プロテアーゼで処理し、次いで広範な透析を行うこと；および
 h) 非濾過性生成物を凍結乾燥すること

からなる段階をさらに含む請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

15. 請求項1の方法により製造した生成物。
 16. 請求項2の方法により製造した生成物。
 17. 請求項3の方法により製造した生成物。
 18. 請求項4の方法により製造した生成物。
 19. 請求項5の方法により製造した生成物。
 20. 請求項6の方法により製造した生成物。
 21. 請求項7の方法により製造した生成物。
 22. 請求項8の方法により製造した生成物。
 23. 請求項9の方法により製造した生成物。
 24. 請求項10の方法により製造した生成物。
 25. 請求項11の方法により製造した生成物。
 26. 請求項12の方法により製造した生成物。
 27. 請求項13の方法により製造した生成物。
 28. 請求項14の方法により製造した生成物。
 29. 無秩序に散在したアセチル基が、酸素原子を介してポリマーに結合しており、かつD-ガラクトピラノースが、70モノマー単位当たり約1つのD-ガラクトピラノース残基の比でα(2-6)結合を介してポリマー結合しているところの、線状β(1-4)-D-マンノシル単位からなる実質的に非分解性の凍結乾燥したポリマーを含む組成物。
 30. 前記ポリマーがガンマ線またはマイクロ波で照射される請求項29記載の組成物。
 31. アセチル化の程度が、モノマー当たり約0.8アセチル

基である請求項29記載の組成物。

32.



を含む繰り返しモノマーを有し、ここでアセチル化の程度がポリマーのモノマー当たり0.8アセチル基であり、ガラクトピラノース単位が70モノマー単位当たり約1の比でポリマーに結合しており、マンノースのガラクトースに対する比が約20:1である、実質的に非分解性の凍結乾燥した線状ポリマーを含む組成物。

年月 日 年 月 日

アロエ製品の製造方法

関連出願

本出願は、米国出願シリアル番号869,261号の一部継続であり、その全内容および開示がここで参考として具体的に組み込まれる。前記米国出願シリアル番号869,261号は、1985年6月20日に出版され、1987年1月15日に国際公開番号WO 87/00052のもとに公開された国際出願番号PCT/US 86/01335号に対応しており、その全内容および開示もまたここに参考として具体的に組み込まれる。前記米国出願シリアル番号869,261号は、1985年12月17日に出版された米国出願シリアル番号810,025号（現在、放棄された）の一部継続であり、これは1985年7月12日に出版された米国出願シリアル番号754,859号（現在、放棄された）の一部継続であり、これは1985年6月28日に出版された米国出願シリアル番号750,321号（現在、放棄された）の一部継続であり、これは1984年9月12日に出版された米国出願シリアル番号849,967号（現在、放棄された）の一部継続であり、これは1982年5月7日に出版された米国出願シリアル番号875,720号（現在、放棄された）の一部継続である。前記シリアル番号869,261号は、アロエ製品の製造方法、それにより得られた製品およびその組成物とい

A. アフリカーナ (*A. africana*)、A. フェロックス (*A. ferox*) およびアロエ ペリイ (*Aloe pernyi*)がある。レイノルズ アロエズ オブ トロピカル アフリカ アンド マダガスカル (*Aloes of Tropical Africa and Madagascar*)、ザ トラストイーゼス (The Trustees)、アロエ記録基金 (The Aloe Book Fund)、ババネ スワジランド (Khabane Swaziland)、しかし、A. バルバデンシスミラーは、広く用いられ、いわれるところの最も効果的な治療力のため、「真のアロエ」として一般的に認められているが、日本ではA. アルボレッセンシス ミラー (*A. arborescens Hiller*) が胃腸疾患から水虫までの範囲にわたる種々の病気のための民間治療薬として、伝統的に用いられてきた。

アロエ ベラは、ロゼット模様で茎に結合しているふくらんだ緑の葉を持つ多年生植物である。成熟した植物の葉は縁に沿ってのこぎり模様の鋭い先を持ち、長さ25インチより大きくなりうる。

第1図および第2図に示したように葉を横断的に切ると、厚いクチクラで覆われた表皮3の外壁が見える。表皮3の下に、柔組織として知られている葉緑組織細胞とより薄い壁で仕切られた細胞とに区別される葉肉がある。柔組織細胞は透明な粘液質のゼリー1を収容する。内に維管束細胞を有する維管束2は緩下剤特性を有する黄色の液汁を含み、また2つの主要な細胞にはさまれている。植物細胞で代謝副産物として生成されるシュウ酸カルシウムの針状結

晶が、葉の中央部分で主に見つかる。アロエ ベラは2つの主要な液源、すなわち黄色のラテックス（分泌物）と透明ゲル（粘液）を含んでいる。アロエ バルバデンシス ミラーの葉の乾燥させた分泌物をアロエという。商業的名称はクラカオ アロエ (Curacao aloe)である。それは主としてアロイン、アロエ-エモジンおよびフェノールからなる。ブルース (Bruce)、サウス アフリカン メディカル ジャーナル (*South African Medical Journal*)、41: 984 (1967)；モロー (Harrow) ら、アーキ デルマトロジー (*Arch. Dermatology*)、116: 1064-1065 (1980)；サレク (Salek) ら、コロージョン プリベンション&コントロール (*Corrosion Prevention & Control*)、9-10 (1983)；マップ (Happ) ら、プラントメディカ (*Planta Medica*)、18: 351-355 (1970)；ランワルド (Ranwald)、アーキ ファーマコロジー (*Arch. pharmacology*)、315: 477-478 (1982)。アントラキノン類およびそのグリコシド類を含む多くのフェノール類が、薬剤的に活性であることが知られている。ブルース (Bruce)、エクセルサ (*Excelsa*) 5: 57-68 (1975)；スガ (Suga) ら、コスメティック アンド トイレtries (*Cosmetic and Toilettries*)、58: 105-108 (1983)。

発明の背景

1. 発明の分野

この発明はアロエ植物を処理し、この植物の一部を取り出して局所用ならびに内服用の組成物に処理する技術ならびにこのアロエの部分を含む組成物に関する。

2. 従来技術の説明およびその他の情報

アロエ ベラは広く信じられていたようなサボテン植物ではなく、むしろユリ科の仲間である。約 800種のアロエ植物が知られている。ハーディング、アロエズ オブ ザ ワールド (*Aloes of the World*)；ア チェックリスト インデックス アンド コード (*A Checklist, Index and code*)、エクセルサ9 (*Excelsa 9*)；57-64 (1979)がある。それらは暑い乾燥した地方に生育するようであり、地中海、中東、アフリカ、中国、日本、メキシコおよびアメリカ合衆国南部から広く散在している。その医薬特性のために用いられるいくつかの重要な種に、アロエ バルバデンシス ミラー (*Aloe barbadensis Miller*) (アロエベラ)、A. アルボレッセンシス (*A. arborescens*)、A. プリカチリス (*A. plicatilis*)、A. バボンベ (*A. vahombe*)、A. サボナリア (*A. saponaria*)、

品が、葉の中央部分で主に見つかる。

アロエ ベラは2つの主要な液源、すなわち黄色のラテックス（分泌物）と透明ゲル（粘液）を含んでいる。アロエ バルバデンシス ミラーの葉の乾燥させた分泌物をアロエという。商業的名称はクラカオ アロエ (Curacao aloe)である。それは主としてアロイン、アロエ-エモジンおよびフェノールからなる。ブルース (Bruce)、サウス アフリカン メディカル ジャーナル (*South African Medical Journal*)、41: 984 (1967)；モロー (Harrow) ら、アーキ デルマトロジー (*Arch. Dermatology*)、116: 1064-1065 (1980)；サレク (Salek) ら、コロージョン プリベンション&コントロール (*Corrosion Prevention & Control*)、9-10 (1983)；マップ (Happ) ら、プラントメディカ (*Planta Medica*)、18: 351-355 (1970)；ランワルド (Ranwald)、アーキ ファーマコロジー (*Arch. pharmacology*)、315: 477-478 (1982)。アントラキノン類およびそのグリコシド類を含む多くのフェノール類が、薬剤的に活性であることが知られている。ブルース (Bruce)、エクセルサ (*Excelsa*) 5: 57-68 (1975)；スガ (Suga) ら、コスメティック アンド トイレtries (*Cosmetic and Toilettries*)、58: 105-108 (1983)。

その植物の柔組織細胞からの粘液質のゼリーをアロエベラ ゲルという。ゲルが不適当な処理技術によって汚染されなければ、分解したり、ゲルの変色の原因となるアン

トラキノンとは通常存在しない。

アロエ ベラ ゲルは、約98.5重量%水である。全固形分の60%より多くが炭水化物起源のポリサッカライドからできている。有機酸および無機化合物、特にシュウ酸カルシウムが固形分の残余を成す。

アロエ植物の葉全部、渗出液および新鮮なゲルが、人間の種々の苦痛のために用いられてきた。医療の治療薬としてそれを使用した証拠は、紀元前 400年のエジプト人にさかのぼることができる。アロエ ベラはまた死体に防腐保蔵処理を施し、かつ死を引き起こすものから死体の防腐保蔵処理者を保護するために用いられた。他の初期の文明はアロエ ベラを、皮膚の手入れ、虫に刺されたりくわれたりした傷の手当て、かき傷の処置、傷の治療、髪が失われたときのためや下剤として、また保湿化した皮膚のために用いられた。それは駆虫剤として、下剤として、健胃剤として、多くの文化の伝統的な薬であり、そしてとりわけ瘡病、火傷およびアレルギー性の病気のために用いられた。コール(cola)ら、アーキブス オブ ダーマトロジー アンド シフィロロジー (Archives of Dermatology and Syphilology), 47: 250(1943); コプラ(Chopra)ら、グロサリー オブ インディアン メディシナル プランツ (Glossary of Indian Medicinal Plants), カウンシル オブ サイエンティフィック アンド インドストリアル リサーチ (Council of Scientific and Industrial Research), ニュー デリー (New Delhi); シップ(Ship),

ジャーナル オブ アメリカン メディカル アソシエーション (Journal of American Medical Association), 288: 1770-1772(1977); モートン (Horton), アトラス オブ メディカル プランツ オブ ミドル アメリカン バハマズ トウ ユカタン (Atlas of Medical Plants of Middle American Bahamas to Yucatan), チャールズ C. トマス E D., (Charles C. Thomas ED.), 78-80(1981); ディーズ-マーチンズ (Díaz-Martínez), ラ ザビラ (La Zabilla), コミュニカド No. 48 ソブレ レクルソス ビオティコス ポテンシヤレス デル バイス (Comunicado No. 48 Sobre Recursos Bioticos Potenciales del País), I N I R E B, メキシコ (Mexico) (1981); ダズツール (Dastur), メディシナル プランツ オブ インディア アンド パキスタン (Medicinal Plants of India and Pakistan); D. B. タラボレバラ サンズ (Taraporevala Sons) & Co., プライベート (Private) Ltd., ボンベイ (Bombay) 18-17 (1982)。

アロエ ベラは、「医薬」または「治療性」を持つとして素人の支持 (lay acceptance) の長い歴史を享受してきた。最近数年にわたって、科学的基盤を築いた多くの本や論文が、アロエ ベラについて書かれてきた。アロエ ベラ会議 (Aloe Vera Council) のような組織および公認された医学会が医者、獣医および他の科学者の発表や事例史を通して「アロエ現象」を信じてきた。アロエ ベラは皮

膚科学、特に放射線に原因する皮膚病の治療の領域において広く重要な役割を演じてきた。マッキー (Hackee), X-レイ アンド ラジウム イン ザ トリートメント オブ ディージーズ オブ ザ スキン (X-Rays and Radium in the Treatment of Diseases of the Skin), 第3版, リー アンド フェビガー (Lee and Pebiger), フィラデルフィア (Philadelphia), 819-820(1908); ロバルティ (Robaliti) ら, インドストリアル メディシン アンド サージェリー (Industrial Medicine and Surgery), 28: 384-388(1959); ザワリー (Zavahry) ら, クォテーションズ フロム メディカル ジャーナルズ オン アロエ リサーチ (Quotations From Medical Journals on Aloe Research), 編集マックス (Max) B. スコーセン (Skousen), アロエ ベラ リサーチ インスティテュート (Aloe Vera Research Institute), シプレス (Cypress), カリフォルニア (California), 18-28 (1977); セラ (Cora) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン アニマル ホスピタル アソシエーション (Journal of the American Animal Hospital Association), 18: 888-888(1982)。殺ウイルス剤、殺菌剤および防カビ剤として消化系統の問題における、また婦人科学的病気における医学的適用について記録した一連の科学文献は広範囲であり、グリンドリー (Grindley) とレイノルズ (Reynolds) により、十分に概説された [ジャーナル オブ エトノファーマコロジー (Journal of Ethnopharmacology),

18: 117-151 (1986)]。

アロエにおいて見出された化学品の重要性はまた、それらが誰にも知られている国定薬局方に載せられてきたという事実により示される。U. S. ファーマコペイア (U. S. Pharmacopeia), 第20改訂版, ザ ナショナル フォーミュラリー (The National Formulary), 第14版, ユナイテッド ステイツ ファーマコペイアル コンベンション (United States Pharmacopeial Convention), Inc., ロックビル (Rockville), メリーランド, 1980年7月1日。しかし、U. S. ファーマコペイアはアロエの黄色の液汁の薬効部について述べているが、粘液については述べていない。新鮮な保存されていないゲルは約98.5~99.2%が水である。水を除去した後に残っている全固形分は0.8から1.5%の範囲にある。固形分の主な構成成分は、粘液、糖、繊維、タンパク質、灰分、脂肪、アロインおよび樹脂を含む。ロブソン (Robson) ら, ジャーナル オブ バーン ケア リハビリテーション (Journal of Burn Care Rehabilitation), 3: 157-163(1982)。酵素、有機酸、無機塩、アミノ酸およびアルカロイドを含む組成物の報告がなされている。ロウ (Rowe) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン ファーマシューティカル アソシエーション (Journal of the American Pharmaceutical Association), 30: 282-286(1941); ロボツ (Roboz) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン ケミカル ソサエティ (Journal of the American Chemical Society),

7B: 3248-3249 (1948); ウォーラー (Valler) ら, プロシーディングズ オブ オクラホマ アカデミー オブサイエンス (Proceedings of Oklahoma Academy of Science), 58: 69-78 (1978)。いかにして葉を処理するかに依存して、粘液と糖が脱水したゲルの主成分である。みつかった糖は、ガラクトース、グルコース、マンノース、ラムノース、キシロースおよびウロン酸である。相反する報告が見られるが、粘液は主にマンナンとグルコマンナンからなる。エベレンデュ (Eberendu) ら, ザケミカル キャラクターリゼーション オブ キャリシン (The Chemical Characterization of Carrisyn (登録商標)) (調製); マンドル (Mandal) ら, カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research), 87: 249-258 (1980b); ロボツ (Roboz) ら, ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサエティ (Journal of the American Chemical Society), 75: 3248-3249 (1948); ゴーダ (Gowda) ら, カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research), 72: 201-205 (1979); セガル (Segal) ら, ロイディア (Lloydia), 31: 423 (1988)。

現在、アロエ ベラにおける活性物質の同一性に関する論争は静まっている。それ故に、ゲルに依存する成分と分泌液に見出された成分を明確に区別することが重要である。ゲルの比較的多い部分は、少量の種々の他の化合物を含む主としてポリサッカライド質の粘液である。観察され

(1988); ウカイ (Ukai) ら, ケム ファーム ブル (Chem. Pharm. Bull.), 31: 741-744 (1983); リーボビシ (Leibovici) ら, アンチキャンサー リサーチ (Anticancer Research), 5: 553-558 (1985)。一般母集団における、特に血統的なコレステロール過多血症 (hypercholesterolemia) における脂肪過多血症 (hyperlipidemia) は冠状動脈の心臓病および死と関連づけられる。食物繊維の摂取量が高い国では、アテローム性動脈硬化症の発現は一般的ではない。トロウェル (Trowell) ら編集, リファインド カーボハイドレート フード アンド ディジーズ (Refined Carbohydrate Foods and Disease), ロンドン (London), アカデミック プレス (Academic Press), 207 (1975)。ベクチンおよびグアーは、正常者および脂肪過多血症患者においてコレステロールを低くすることが報告されている。ケイ (Kay) ら, アメリカン ジャーナル オブ クリニカル ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 30: 171-175 (1977)。ハリエンジュの豆 (Locust bean) のガムは、マンノースとガラクトースからなるポリサッカライドであり、これは正常者および血統的なコレステロール過多血症の人の場合にリポタンパクコレステロールレベルを減少させた。ザボラル (Zavoral) ら, アメリカン ジャーナル オブ クリニカル ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 38: 285-294 (1983)。炭水化物食にグアーガムを添加すると、正常

る活性のいくつかにおいて、ポリサッカライド主成分と他の成分との間の何らかの相乗作用 (synergistic action) がありうると思われる。ロイング (Leung), エクセルサ (Excelsa) 8: 55-68 (1978); ヘンリー (Henry), コズメティック アンド トイレタリーズ (Cosmetic and Toiletries), 94: 42-50 (1979)。例えば、傷の治療に効果的な成分は、傷薬酸 (traumatic acid) (フレイタグ (Freytag), ファーマツィー (Pharmazie), 9: 705 (1954)) およびポリサッカライドの一種でありうるものが数人の研究者によって報告されている。カワシマ (Kawashima) ら, ケミカル アブストラクツ (Chemical Abstracts), 93: 13075 (1979)。上記のマッキー (Hackee) は、ゲル (外皮や分泌液ではなく) は、放射線火傷の治療に有益な効果の原因となることを記し、そして彼は効果的な治療のために新鮮な葉を用いることの重要性を強調した。ポリサッカライドは、時間とともに分解する。そしてある分子量サイズが特定の薬理学的応答を引き出すのに必要とされる。ゴトウ (Goto) ら, ガン (Gann), 53: 371-374 (1972)。

他の成分からの公知の相乗作用的助力なしに薬理学的および生理学的活性を示すポリサッカライドについて多くの例が文献にある。オオノ (Ohno) ら, ケム ファーム ブル (Chem. Pharm. Bull.), 33: 2564-2568 (1985); リーボビシ (Leibovici) ら, ケム バイオル インターアクションズ (Chem. Biol. Interactions), 80: 191-200

および糖尿病の人の両方において、食後のグルコースの上昇を抑えた。ジェンキンズ (Jenkins) ら, ランセット (Lancet), 2: 779-780 (1977)。クルル (Kuhl) らは、グアーガムが妊娠しているインシュリン依存糖尿病患者の血糖制御を示すことを証明した [ダイアビーツ ケア (Diabetes Care), 6: (2): 152-154 (1983)]。

ポリサッカライドの抗腫瘍活性は広く報告されている。レンティヌス シアチフォルミス (Lentinus cyathiformis) から調製したポリサッカライドは、腫瘍に対して宿主防御を増加させることが知られている。レティ (Rethy) ら, アヌアルス オブ イムノロジー ハンガリー (Annals of Immunology Hungary), 21: 285-290 (1981)。ウイルスや腫瘍の侵入に対しての高程度の宿主防御活性を引き出す、マッシュルーム、イースト又はバクテリア抽出物由来のポリサッカライドについていくつかの報告がある。チハラ (Chihara) ら, ネイチャー (Nature), 222: 687 (1969); シュワルツマン (Schwartzman), プロク ソク イクスベ バイオルメッド (Proc. Soc. Exper. Biol. Med.), 29: 737 (1932); レティ (Rethy), エックス インターナショナル コンGRESS オブ ミクロバイオロジー: モスクワ (X. International Congress of Microbiology: Moscow), 642 (1956)。スズキ (Suzuki) らはまた、菌類、グリフォラ フロンドサ (Grifolia frondosa) の培養した子実体 (fruiting bodies) から抽出したポリサッカライド成分の

抗腫瘍活性について報告した〔ジャーナル オブ ファーム デイン (*Journal of Pharm. Dyn.*), 7: 492-500 (1984)〕。画分 (GF-1) は、腹腔内 (IP)、静脈内 (IV) および腫瘍内 (IT) 投与した時に、より高い阻害活性の等価レベルを示した。しかし、経口投与 (PO) は効果的でないことが報告された。GF-1 はまた、マウスでメタ (Meth) A 繊維肉腫および MM46 癌の固形形に対して、抗腫瘍活性を示した。レンチナン (lentinan) は GF-1 に似た 6-分枝 B-1-3-結合グルカンであり、これはメタ A 繊維肉腫に対して効果がない。チホラ (Chihora), 抗腫瘍ポリサッカライド レンチナン: 総説; 「宿主防御機構の操作 (Manipulation of Host Defense Mechanism)」; アオキ (Aoki) 編, エクセプタ メディカ (*Excerpta Medica*), 北オランダ, 1-16 (1981); ササキ (Sasaki) ら, カーボハイドレート リサーチ (*Carbohydrate Research*), 47: 99-104 (1976), 合成した分枝ポリサッカライドは腫瘍に対して生物活性を示すことが報告された。マツザキ (Matsuzaki) ら, マクロモル ケム (*Makromol. Chem.*), 188: 449 (1985), マツザキ (Matsuzaki) らは、著しい活性を示す、アイボリーナット (Ivory nut) マンナン由来の分枝ポリサッカライドである。B-(1-4)-D-マンノピラノースおよび B-(1-4)-結合グルコマンナンを合成した〔マクロモル ケム (*Makromol. Chem.*), 187: 325-331 (1986)〕。ディクチオフォリア インドウシアタ

フィッシュ (*Dictyophoria Indusiata Fisch*) の子実体から抽出した、部分的にアセチル化された線状 B-(1-3)-D-マンナンは抗腫瘍活性を示した。ハラ (Hara) ら, カーボハイドレート リサーチ (*Carbohydrate Research*), 149: 111 (1982), B-(1-3)-グルカンタイプのポリマーは、B-(1-4)-グルカンおよびヘミセルロース性ポリマーより高い抗腫瘍活性を示すので、抗腫瘍活性はポリマー主鎖の種類およびその重合の程度に依存するようである。マツザキ (Matsuzaki) ら, マクロモル ケム (*Makromol. Chem.*), 187: 325-331 (1986), 細菌の培養濾過液から得た B-(1-3)-グルカンのカルボキシメチル化誘導体は、確立されたサルコマ 180 腫瘍から、誘導体の注入後 2 時間以内に重大な細胞損失を引き起こした。ババ (Baba) ら, ジェー オブ イムノファーマコロジー (*J. of Immunopharmacology*), 8: 509-572 (1986), 同じ著者は、その物質の注入による、多形核白血球での代償的な増加を観察した。ところで、ベスタチン (vestatin) は、免疫調節および抗腫瘍活性を持つことが知られているジペプチドであり〔イシズカ (Ishizuka) ら, ジャーナル オブ アンチバイオティクス (*Journal of Antibiotics*), 32: 842-852 (1980)〕、これは腫瘍発生にも多形核白血球の総数にも影響を及ぼさなかった。ババ (Baba) ら, 上記。

ヘパライン (heparin) (ジョレス (Jolles) ら, アクタ ユニブ イント キャンサー (*Acta Univ. Int. Cancer*),

16: 682-685 (1980); スエマス (Suemasu) ら, ガン (Gann), 61: 125-130 (1970), 硫酸塩化したラミナラン (laminaran) およびデキストランを含む硫酸塩化したポリサッカライドの抗腫瘍効果について多くの報告がある。ジョレス (Jolles) ら, ブリティッシュ ジャーナル オブ キャンサー (*British Journal of Cancer*), 17: 109-115 (1983), ヤマモト (Yamanoto) らは、さらに硫酸塩化することにより、フコイダン (fucoidan) 画分の抗腫瘍活性を高めることを報告した〔ジャパン ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン (*Japan Journal of Experimental Medicine*), 54: 143-151 (1984)〕。硫酸塩化した生成物は L-1210 白血病に対する活性を示した。著者らは、抗腫瘍活性の機構は部分的に、腫瘍細胞と中皮細胞 (mesothelial cell) との間の静電的反発作用から生じる L-1210 細胞の侵入生長の阻害によるものでありうると仮定した。ヤマモト (Yamanoto) ら, 上記。硫酸塩基を持つポリサッカライドはまた、ヒトの T 細胞マイトゲン (mitogen) およびネズミ科のポリクローナル B 細胞活性化剤であることが報告されている。スガワラ (Sugawara) ら, ミクロバイオロジカル イムノロジー (*Microbiological Immunology*), 28: 831-839 (1984), 一般に、硫酸塩基を有する高分子量のホモポリサッカライドはこれらの特性を持っている。ドリーズ (Dorries) ら, ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー (*European Journal of Immunology*), 4: (19) ;

スガワラ (Sugawara) ら, セル イムノロジー (*Cell Immunology*), 74: 162-171 (1982)。

イーストのサッカロマイセス セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から抽出したグルカンは細胞性および体液性免疫を調節するものであることが報告された。ウーレス (Woolles) ら, サイエンス (*Science*), 142: 1078-1080 (1963), ポリサッカライドはまた、ネズミ科の多能性造血幹細胞、顆粒球-マクロファージコロニー形成細胞および骨髄性および赤血球コロニー形成細胞の増殖を刺激した。ポスピシル (Pospisil) ら, エクスペリエンティア (*Experientia*), 38: 1232-1234 (1982); ブルガレタ (Burgalato) ら, キャンサー リサーチ (*Cancer Research*), 37: 1739-1742 (1977), マイシン (Malsin) らはまた、X線にさらされることに対するネズミ科の造血幹細胞の保護を引き起こし、それによってそのようにさらされたマウスの死亡率を減少させる、ポリサッカライドの IV 投与を報告した〔ラジエーション リサーチ (*Radiation Research*), 105: 276-281 (1986)〕。

セルジェリッド (Seljelid) らは、不溶性またはゲル形成性グリカンがインビトロ (*in vitro*) でマクロファージを活性化し、一方対応する可溶性のグリカンは活性化しないことを観察した〔エクスペリメンタル セル リサーチ (*Experimental Cell Research*), 131: 121 (1981)〕。彼らは、グリカンが単核食細胞に提示される方法が活性化のために決定的であると仮定した。ボグワルド (Bogwald)

らは、インビトロでマクロファージに刺激効果を持つグリカンを固定した〔スカンド ジャーナル オブ イムノロジー (Scand. Journal of Immunology), 20: 355-360(1984)〕。これにより著者らは、グリカンの固定したまたは立体的配置の程度がインビトロでのマクロファージへの効果に決定的であると信ずることとなった。カンジダアルビカンス (*Candida albicans*) から単離した精製ポリサッカライドは人間の末梢血液リンパ球によりインビトロでの抗体応答を引き起こした。ウィルツ (Wirtz) ら、クリニカル イムノロジー アンド イムノパソロジー (Clinical Immunology and Immunopathology), 33: 199-209(1984)。正常およびカンジダ感染個体の血清中の抗カンジダ抗体の間には著しい差があった。ウィルツ (Wirtz)。上記。

ポリサッカライドおよびペプチドに結合したポリサッカライドの抗ウイルス活性が観察された。スズキ (Suzuki) ら、ジャーナル アンチバイオティクス (Journal Antibiotics), 32: 1338-1345(1979)。上記のスズキらはレンティヌス エドデス (*Lentivirus edodes*) の培養菌糸体から抽出したペプチドマンナン (KS-2) の抗ウイルス作用を報告した。経口 (PO) 投与および腹腔内 (IP) 投与のいずれも、ウイルス感染に対してマウスを保護する最大血清インターフェロン力価を増加させる結果となった。これは、マウスに静脈内 (IV) または腹腔内 (IP) 投与した場合のみインターフェロンのより高い力価を引

き起こすデキストランホスフェート (DP-40) (スズキ (Suzuki) ら、プロク ソク エクスプ バイオル メッド (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.), 149: 1009-1076(1975)) および9-メチルストレプトイミドン (9-MS) (サイトウ (Saito) ら、アンチミア エージェント & ケモセラピー (Antimicrobial Agent & Chemotherapy), 10: 14-19(1970)) とは異っていた。

アロエ ベラ ゲルの抗炎症活性は、口頭の実験および尊重されている科学雑誌の両方により広く報告されてきた。ルベル (Rubel) は、アロエ ゲルの抗炎症効果の可能な機構について十分論じた (コスメティックス アンド トイレタリーズ (Cosmetics and Toiletries), 98: 109-114(1983))。ウカイ (Ukai) らは、いくつかの歯頤の子実体から抽出したポリサッカライドにおける抗炎症活性に注目した (ジュー ファーマコロジー ディン (J. Pharmacology Dyn.), 8: 983-990(1988))。ポリサッカライドは、浮腫を引き起こすカラギーナンでの著しい阻害効果を証明した。ポリマーの1つであるO-アセチル化-D-マンナン (T-2-HN) は、さらに、フェニルブタゾンより火傷の腐敗過敏感症におけるより顕著な阻害効果を証明した。ウカイ (Ukai) ら、上記。ポリサッカライドがタンパク質および脂質から遊離していると言われる事実は、抗炎症効果がアセチル化されたマンナンのみによることを強く示唆している。他の研究者達はまた、複合ポリサッカライド (サエキ (Saeki) ら、ジャパン ジュー

ファーマコロジー (Japan J. Pharmacology), 24: 109-118(1974))、グリコプロテイン (アリタ (Arita) ら、ジュー ファーマコロジー (J. Pharmacology), 24: 861-889(1974)) および硫酸塩化したポリサッカライド (ロカ (Rocha) ら、バイオケミカル ファーマコロジー (Biochemical Pharmacology), 18: 1285-1295(1969)) の抗炎症効果について報告した。

薬理学的および生理学的活性を証明するポリサッカライドの文献報告は、よく尊重される科学雑誌のページへ殺到し続けている。それ故に、アロエ ベラの粘液質のゲルが本質的にポリサッカライドであり、これがアロエ ベラの医薬特性に秘密を持つことは非論理的ではない。ポリサッカライドがグルコマンナン、マンナン、ペクチンまたはいくつかの他の組成物であるかどうかについての不一致は、化学的精製段階の結果である。本発明によるアロエの製造により、部分的にアセチル化されたポリマンノースが薬理学的活性を有する主要ポリサッカライドとして一貫して単離された。ヤギ (Yagi) らは、少し変形した抽出法を用いて、アロエ アルボレッセンシ ミラー バー ナタレンシス (*Aloe arborescens Miller var. natalensis*) からアセチル化されたマンナン (アロエマンナン) を単離した (プランタ メディカ (Planta Medica), 31: 17-20(1977))。しかし、オボドバ (Ovodova) は、同じアロエ種の主成分としてペクチンをより早くに単離した (キム プライアー ソエディン (Khim. Prior. Soedin), 83:

93883(1976))。

発明の要約

本発明はアロエ植物中の活性化学物質をアロエの葉全体から物理的に抽出する方法に向けられている。この化学物質は実質的に非分解性であり、定められた量で投与されることができる。

本発明はまた、上記した方法により生成した形でのアロエ植物中の活性化学物質に向けられている。この活性化学物質は、実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの実質的に非分解性の凍結乾燥した線状ポリマーであることが見出された。マンノースモノマーは好ましくはβ(1-4)結合により互いに結合される。この活性化学物質は、分析化学の手法により、測定され、標準化され、そして特徴づけられた。

ここで使用されたような用語「活性化学物質」とは、アロエ ベラの傷の治療性および他の有益な特性の原因となる物質を意味する。ここで使用されたような用語「実質的に非分解性」とは、2年間に亘り分子量の減少が5%未満である物質であって、かつ2年間に亘りその生物活性を95%より多く維持する物質を意味する。ここで使用されたような用語「実質的にアセチル化されたマンノースモノマー」とは、部分的にまたは実質的に完全にアセチル化されたマンノースモノマーを意味する。

本発明の方法は、アロエ植物の葉から、アロエ植物中の活性化学物質を抽出するための1つの方法であり、少なく

とも以下の工程を基本的に含む：

- (a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して、実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
- (b) 前記洗浄した葉から、少なくとも第1の端部を除去すること；
- (c) 前記の切断し洗浄した葉からアントラキノンに富む液汁を排液し、保存し、採集すること；
- (d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないアロエ ゲル フィレットを製造すること；
- (e) 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエ ゲル フィレットを挽きそして均質化して、実質的にアントラキノンを含まない、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること；
- (f) アロエジュースに、水溶性低級脂肪族極性溶媒を添加して活性化学物質を析出させ、それにより不均一溶液を形成させること；
- (g) 不均一溶液から、水溶性低級脂肪族極性溶媒および可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること；および
- (h) 析出した活性化学物質を乾燥すること。

この技術分野の当業者は、いかなる可能な手段でも、アロエの葉から可溶化物を有するアロエジュースを得ることができ、次いでこのジュースを工程(f)、(g)および(h)に供して活性化学物質を抽出することができることを認識するであろう。

オンから効果的に分離される。

この技術分野の当業者は、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出するための別の方法が以下の工程を含むことを認識するであろう：

- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
- b) 前記葉から外皮を除去して、アロエ ゲル フィレットを製造すること；
- c) 前記アロエ ゲル フィレットを挽きそして均質化して、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること；
- d) アロエジュースに、水溶性低級脂肪族極性溶媒を添加して活性化学物質を析出させ、それにより不均一溶液を形成させること；
- e) 不均一溶液から、水溶性低級脂肪族極性溶媒および可溶化物を除去して、析出した活性化学物質を単離すること；および
- f) 析出した活性化学物質を乾燥すること。

上記したように、アントラキノンおよびイオンが水溶性であり、液体溶媒相に残り、かつ析出しないので、活性化学物質はこの方法により、アントラキノンおよび有害なイオンから効果的に分離される。

ここで用いられているように「実質的にすべての表面の汚れとバクテリア」の除去とは(1)残存する汚れが葉の重量の0.1重量%未満となる程度まで汚れを除去すること、および(2)残存する表面のバクテリアが葉1g当たり100個

確かにこの技術分野の当業者は、工程(b)、(c)および(d)に替えて代わりに(b)洗浄したアロエの葉を砕きそして(e)砕いた葉を透析して好ましくない画分、すなわちアントラキノン、無機物および酸、ならびに外皮を化学的に除去して実質的にアントラキノンを含まないゲルを生成し、次いで工程(e)、(f)、(g)および(h)に供して活性化学物質を抽出することができるということを認識するであろう。

この技術分野の当業者はまた、工程(b)、(c)、(d)および(e)に替えて代わりに洗浄したアロエの葉を砕きそして可溶化物を有するアントラキノンに富んだアロエジュースを押し出し、次いでアロエジュースを工程(f)、(g)および(h)に供して活性化学物質を抽出することができるということを認識するであろう。活性化学物質は、アントラキノンおよびイオンが水溶性であり、液体溶媒相に残り、かつ析出しないので、この方法によりアントラキノンおよび有害なイオンから効果的に分離される。

この技術分野の当業者はまた、工程(b)、(c)、(d)および(e)に替えて代わりに洗浄したアロエの葉全部を挽き、繊維状物質を濾別し、そして残りを均質化して可溶化物を有するアントラキノンに富んだアロエジュースを生成することができることを認識するであろう。次いでアロエジュースを工程(f)、(g)および(h)に供して活性化学物質を抽出することができる。活性化学物質は、上記した理由のためにこの方法によりアントラキノンおよび有害なイ

素濃となるように表面バクテリアを殺すことを意味している。

さらに私の好ましいプロセスは、さらにアロエジュースもしくはアロエ ベラ画分を浸透圧的に調節するためにあるいはアントラキノンの濃度をさらに5 ppm未満あるいはさらに100 重量ppb未満にさえ引下げるために限外濾過の工程を含むことができる。

これらの工程は加工業者が大きな葉あるいは1年未満の小さな葉さえを使用することを可能にする。というのは成熟した葉に見られるポリマーサイズがより小さい未成熟の葉から選別され処理され得るからである。

このプロセスの利点の1つは、強風や採集方法が適切でなかったことにより使用不可能と従来は考えられていた損傷した葉を処理することができること、および望ましくない汚染物を透析によって除去することができることである。

この限外濾過(透析)工程は膜技術を含んでいる。この膜技術は切断されたアロエの葉の状態に依存して、異なるポアサイズを有するフィルターの選択を可能にし、次のいかなる組合せも達成することができる：

- (1) 必要な場合にはアロエ ベラ ゲルから水と塩を分離する小さなポアサイズのフィルター(好ましくは約100ダルトン)。
- (2) 必要な場合にはアロエ ベラ ゲルから酸を分離することができる大きなポアサイズのフィルター(好ましくは約500ダルトン)。

(3) 必要な場合にはアロエ ベラ ゲルから黄色い液汁成分を分離することができるさらに大きなポアサイズのフィルター（好ましくは約2000ダルトン）。

(4) およびゲルマトリクスポリマーを分類し、分子量によってこれらを分離することができるさらに大きなポアサイズのフィルター（好ましくは約10,000〜100,000ダルトン）。

限外濾過装置としてはロミコン 4-カラム（ロミコン社、100 カミングスパーク、ウォーバーン、MA 01801、モデル No.HF4 SSS、メンブランタイプPH 50、メンブランNo.H526、5-43-pw50）（Rohicon 4-column (Rohicon Co., 100 Cummings Park, Woburn, MA 01801, Model No.HF4 SSS, Membrane Type PH50, Membrane Nos. H526, 5-43-pw50)）が推奨される。

別の好ましい実施形態として、このプロセスの洗浄工程は前記フィレットを除くのに先立ってタンブラーウォッシャー中で実質的にアントラキノンを含まないアロエ ゲル フィレットを洗浄することを含むことができる。

アロエ ベラ ゲルから活性物質を抽出する上記した方法のすべての間に、少量の有機物質および無機物質が生成物といっしょに析出することが見出される。無機塩の多い部分はシュウ酸カルシウムを含む。シュウ酸カルシウムのような無機塩の存在は生成物のコンシステンシーのため、および健康上の理由で除去されるかまたは少なくとも最小限に押えなくてはならない。アルコールの添加に先立って

ゲルのpHを約3.0 から約3.5に調整するために有効量の鉱酸を添加することにより、生成物が実質的により低い濃度のシュウ酸塩および他の無機塩類を有するという結果になることが、驚くべきことにここで見出された。したがって、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出するための上記の方法のすべてにおいて、ゲルのpHは、アルコールの添加に先立って約3.0 から約3.5に調整されることが好ましい。

好ましくは、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する上記すべてのプロセスにおいて、1容量のアロエジュースに対して4倍量の水溶性低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を析出させることが好ましい。好ましい水溶性低級脂肪酸極性溶媒は、メタノール、エタノールおよびプロパノールである。最も好ましい溶媒はエタノールである。この技術分野の当業者は、活性化学物質がそれから沈殿する限り、好ましい溶媒の代わりにその他の水溶性低級脂肪酸極性溶媒を使用することができることを認識するであろう。

上記抽出プロセスにおいて、活性化学物質が水溶性低級脂肪酸極性溶媒とアロエジュースの混合物から約4時間で放置沈殿せしめられることが好ましい。この混合物を4時間で放置沈殿せしめると最適収量の活性化学物質が得られること、4時間を越えると沈殿した活性化学物質が分解を始めることがわかった。しかし24時間の沈殿期間後にはかなりの量の活性化学物質が回収されるということもわかった。

この技術分野の当業者は、最適な沈殿時間が周囲温度、圧力ならびに水溶性低級脂肪酸極性溶媒の性質に依存するということを認識するであろう。

上記抽出プロセスにおいて、熱は活性化学物質の加水分解や分解を助長しうるので、沈殿した活性化学物質はオーブン乾燥するよりも凍結乾燥によって乾燥することが望ましい。

上記抽出プロセスのすべてにおいて、アロエジュース中に含まれる何らかの繊維状物質（セルロース）も水溶性低級脂肪酸極性溶媒によって析出される（precipitated）が、これはこの溶媒の添加によって早期に析出し、活性化学物質より密度が低い。この繊維状物質は、活性化学物質が沈降せしめられた後、溶媒の表面に停まる。従って極めて容易にこれを取り除くことができる。この技術分野の当業者は、溶媒を添加する前に、代りにアロエジュースを濾過して繊維状物質を除去することができることを認識するであろう。

さらに好ましくは、上記プロセスのすべてにおいてアロエの葉または植物全体は、洗浄工程を省略することができる程に十分に洗浄した葉から採集されう。

乾燥した析出活性成分は所望によりガンマ線またはマイクロ波を照射して前記活性化学物質を殺菌し保存することができる。

従って本発明は、アロエベラ製品の製造のための新規かつ改良された方法を提供すると信じる。

本発明はさらに、アロエ植物の葉の明瞭に特徴的な部分の望ましくない組合せまたは混合を防止するやり方でアロエ ベラ植物の葉を処理する改良された方法を提供するとさらに信じる。

本発明はさらに、仕上がった抽出物中の望ましくない成分の濃度を最少にする、アロエ ベラ植物の葉の種々の抽出物を製造するための改良された方法を提供するとさらに信じる。

本発明はまた、アロエ ベラ植物の葉の特定の部分又はセグメントを特徴づける或る成分の濃度を最大にし、かつその葉の他の部分又はセグメントを特徴づける或る成分を最少にし、もしくはなくすような、アロエ ベラ植物の葉の抽出物を製造するための新規かつ改良された方法を提供すると信じる。

本発明はまた、アロエ ベラ植物の葉の黄色い液汁の濃度が低い、アロエ ベラ植物の葉からの抽出物を製造するための新規かつ改良された方法を提供すると信じる。

本発明は最後に、アロエ ベラ ゲル中の活性化学物質を抽出する方法を提供すると考えられる。この化学物質は非毒性免疫刺激化合物としての有用性を持つ。この物質は以下で、カリシン（Carrisin）（商標）またはアセマンナン（acemannan）と呼ぶことにする。上記のようにアセマンナンは、分析化学の手法により標準化されそして特徴づけられた実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの実質的に非分解性の凍結乾燥された線状ポリマーであること

がわかった。

図面の説明

第1図および第2図は、アロエ ベラの葉の切取った部分を示している。

第3図は、本発明の方法に使用される好ましい葉洗浄装置の概略図を示す。

第4図はアロエ ベラの葉を切断し浸漬するための好ましい装置の概略図を示す。

第5図はアロエの切断物を細断してフィレットにし、かつ粗砕する好ましい装置の概略図を示す。

第6図は微細に均質化しかつ濾過するための好ましい装置の概略図を示す。

第7図は処理されたアロエ材料をさらに分離するための濾析装置の好ましい使用を示す概略図を示す。

第8図は異なるpH条件下でカリシンの2つのサンプルについての赤外線スペクトルを示す。

第9図はカリシンの示差温度記録図を示す。

第10図はシュウ酸カルシウムで汚染されたカリシンの示差温度記録図を示す。

第11図はカリシンの特性化の概略図を示す。

第12図はプルラン (pullulan) ポリサッカライド標準物のサイズ排除クロマトグラムを示す。

第13図はカリシンのサイズ排除クロマトグラムを示す。

第14図はプロテアーゼ処理されていないカリシンの赤外線スペクトルを示す。

第15図はプロテアーゼ処理したカリシンの赤外線スペクトルを示す。

第16図はカリシンの示差温度記録図を示す。

第17図はグルコース、ガラクトース、マンノースおよびイノシトールの標準混合物のHPLCクロマトグラムを示す。

第18図はカリシンのHPLCクロマトグラムを示す。

第19図はラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコースおよびイノシトールの、それらのグリシトールアセテートとしての、標準混合物のGLCクロマトグラムを示す。

第20図はカリシンのGLCクロマトグラムを示す。

第21図はアセマンナンの量に対するマンノース/イノシトール比の標準曲線を示す。

第22図はカリシンの部分的にメチル化した、かつ部分的にアセチル化したグリシトールの総イオンクロマトグラムを示す。

第23図はカリシンの部分的にアセチル化したグリシトールのマスマスペクトルを示す。

第24図は部分的にメチル化したマンニトールアセテートの概略図を示す。

第25図はマスマスペクトル分析下でメチル化したマンニトールアセテートのフラグメントイオンの概略図である。

好ましい実施態様の詳細な説明

黄色い液汁と内部ゲルマトリクスの細分部分 (sub-

portions) がこれらの細分部分に特徴的な特性をもっていること、従ってそれらからの抽出物が相互に潜在的に識別し得る用途をもっていることを発見し、これを認識した。これらの識別し得る部分、これらの特性のいくつかのもの、および潜在的な用途のまとめは次の通りである。

部 分	細 部 部 分	用 途
黄色い液汁	(1) 沈 殿 物	緩下剤、防ばい剤 (antifungal)、抗生物薬剤 (antibiologicial)、殺虫剤および日焼け止め剤
	(2) 上澄み液	粘膜保護作用、日焼け止め剤
内 部 ゲ ル マ ト リ ク ス	(1) 粘 液	浸透剤、低アレルギー剤 (hypoallergenic)、湿潤剤
	(2) ゲ ル フィレット	潰瘍保護剤、細胞刺激剤、湿潤剤、創傷治癒
	(3) 間 質 纖 維	天然防腐剤、止血剤
	(4) ミセルリウム	細胞生長刺激剤
外 反		殺虫性昆虫忌避剤、紙パルプ繊維

上記の知識ならびに認識に基づき、かつその意図された用途に依存して最終抽出物中の望ましい成分の質および濃

度を最適化するために、本発明のプロセスはアロエ ベラ植物の葉を特定の識別し得る部分と上記の細分部分に先ず分画すること、ならびに上記に定義したような細分部分の特定成分を分離し、かつ単離することに向けられている。このようなプロセスの具体的な詳細ならびに特徴は、以下の詳細な説明からさらに容易に理解され、また認識されることになる。本発明はまた、上記プロセスによって単離される特定の成分に向けられている。

本発明のプロセスによって製造される生成物は好ましくは、成熟した、戸外で生育したアロエ ベラ植物の外部の低い部分の葉から得られる。2年ものの植物は通常成熟している。しかし4年～5年ものの植物のより広い葉は、望まれる抽出物を一般により大量に含んでおりまた取扱いもより容易である。テキサス州のリオグランデバレーに生育するアロエ バルバデシス ミラーの4年～5年ものの葉は最も好ましい。これらの葉は、一般にそれぞれ約1.5～2.5ポンドの重さがある。望まれる特定の用途または製品に依存して、これらの葉は植物からそれらを切り取った直後に処理することができ、あるいはこれらは処理される前に種々の時間適当な条件の下に貯蔵することができる。さらに、葉の種々の成分の濃度は、葉が受ける季節的変動および環境条件によって影響を受ける。これらはすべて、植物の抽出物が向けられるべき特定の意図された用途に従って考慮されなければならない。

葉は、好ましくは処理に先立って葉のいかなる部分も損

傷することなしに、植物の根元近くから切り取るか引き抜かれるべきである。好ましくはポケットナイフのような6インチ未満の小さなナイフを用い、茎のすぐ上の根元で葉を切り取り、澄んだ細胞のゲルの漏出または黄色い液汁によるゲルの汚染を防止するために茎から葉を剥ぎ取る。葉の何らかの損傷は、識別し得る部分の好ましくない混合をもたらす、従って葉の特徴的成分の好ましくない混合をもたらす。

植物から除去した後、葉は通常これを適切な洗剤の溶液〔例えばヨークケミカル社（テキサス州ダラス）が販売している OLYMPIC POOL CHLOR 85（商標）〕を用いて穏やかにこすってあるいはスプレーして洗浄することによりきれいになる。時には、このクリーニングは柔らかいブラシを用いて行う。洗浄した後、葉を清浄な水の中で十分に濯いで、洗剤溶液の痕跡を除去する。

各々の葉の底の白いもしくは明るい色の部分とその先端部分は、小さな鋭いナイフを用いて注意深く切ることにより除去される。葉の両端を実質的に構成しているこれらの部分は、別途に処理してそこから黄色い液汁を得ることができ、この黄色い液汁は上記の黄色い液汁の特性をもった成分を有する製品を製造することが望ましい用途に向けられる。

各々のアロエ ベラの葉の残存部分は次に、横に切断して短い断片、好ましくは長さが0.5インチの断片にし、各断片を高張性、等張性もしくは低張性であることができる

した部分を除いて残存している黄色い液汁をそこから取り去るべく指できれいにする。この黄色い液汁の残りの除去を容易にするために、穏やかな水のスプレー好ましくは脱イオン水（かつアルコールを含まない）のスプレーを用い、あるいはゲルマトリクス部分をきれいな流水に沈める。

得られたフィレット（内部ゲルマトリクス）を次に約1時間排液することができる。この排液操作の間に、通常粘液質の被膜がこのゲルマトリクスの表面に生成する。この被膜は、重力によってあるいは遠心分離のような適当な手段によって補助されて採集される。この集められた被膜は上記粘液細部分である。

ゲルマトリクスストリップの形をしたゲルマトリクスの残りを次に折りつぶし、細断し、あるいはブレンダーしてその内部に存在する間質繊維を破壊し、あるいはゲルマトリクスストリップを溶化のためにワイヤメッシュまたはフィルタースクリーンを強制的に通過させることができる。この得られた物質を次に続いて均質化することができる。あるいはこのゲルマトリクスストリップを凍結し、解凍し、次に混合して繊維を有する液状物質を製造する（この物質は上記ゲルフィレットの細部分を構成する）。次にこの物質を濾過して、間質繊維細部分を得ると共に、上記残存マトリクス細部分を残す。

このようにして得られた均質化された抽出物は、典型的には約4〜5のpH、好ましくは約4のpHをもっている。

記載されたプロセスにおけるすべての工程はほぼ室温で

水溶液（好ましくは脱イオン水）中に直立に置き、もって断片から黄色い液汁を排出する。あるいは、上記の特徴を有するその他の製剤に使用するために黄色い液汁を採取することが望ましい用途においてはこれらの断片を、好ましくはステンレススチール製のワイヤメッシュの底をもったステンレススチール製の、乾燥採集容器中に直立に置き、放置排液させ、そして水と接触させるために水でもって葉を造折させることができる。

このようにして断片は、約20〜30分間排液することを許される。切断した断片は最終的にシールを形成し排液を停止する。集められた黄色い液汁は次に適当な時間放置すると、2つの細部分すなわち沈澱物と上澄みにそれぞれ分離する。黄色い液汁は無傷の皮膚（損傷されていない皮膚）に対する良好な日焼け止めをつくるのに有用であり、オリーブ色の日焼けした色をもった皮膚を与え、かつまた緩下剤の製造に有用である。

切断した葉の断片から黄色い液汁を除去する操作が完了した後、この断片を次にワイヤー（すなわち家庭用チーズスライサーまたは剥皮ブレード（例えば剥皮ナイフ）のような任意の適当な道具を用いてフィレット（fillets）を形成するように皮を剥いで、外皮すなわち葉の断片の皮およびこの外皮のすぐ下にある層を除去する。葉の断片を凍結してこの剥皮操作を容易にすることができる。剥皮した後、残存しているものは内部ゲルマトリクス部分（フィレット）であり、この部分を検査し、付着している皮もしくは変色

行なわれる。

第3図〜第7図はこのプロセスの好ましい実施態様をさらに詳細に開示している。具体的には第3図には、葉の洗浄装置が開示されている。アロエ ベラの葉の洗浄装置（トンプソン マニュファクチュアリング社、ハリントン、テキサス州（Thompson Manufacturing Company, Harlington, Texas））Aが使用され、それによって葉は最初にバット4で前浸漬される。葉全体は次に手でコンベアベルト8に置かれ、それによって葉は2つのブラシ9aと9bの下に引張られる。コンベアベルト8はモーターとハウジング5から伸びているプーリー6により第2の端部で回転する鎖7を経て駆動されており、これもトンプソン マニュファクチュアリング社から提供されたものである。葉は、第2のブラシ9bを通過して進むことでブラシをかけられかつ洗浄されるので、葉はコンベアベルト8の端部10で検査され、それによって葉は視覚的に検分され、十分にきれいかどうか決められる。十分にきれいでない場合には、さらなる洗浄のためにバット12に入れられ；十分にきれいなら、階段18を有する上部へ移動するコンベアB上に置かれ、それによって個々の葉はそれぞれ噴霧器11により水道水でさらに洗浄されることができる。コンベアBはテキサス州シーゴビルのダラス ミル ライト社（Dallas Mill Wright Co. of Seagoville, Texas）により提供された。すずぎ噴霧器11はテキサス州シーゴビルのキー プランビング（Key Plumbing Seagoville, Texas）により提供された。

ステンレスチールバット12は 316ステンレスチール製であり、テキサス州グラスのナショナル シート メタル社 (National Sheet Metal Company of Dallas, Texas) による特別注文品である。

洗浄後、第4図に示したように葉は切断され浸漬される。コンベア13の階段13を通過して上へ移動した後、きれいな原料葉はくずの除去のための穴15を備えたトレイ14に落ちる。トレイ14は、テキサス州グラスのナショナル シート メタル社 (National Sheet Metal Company of Dallas, Texas) により提供された 316ステンレスチール製の切断および浸漬装置14の部分である。この装置は特別注文製である。トレイ14の上で葉は、穴15を通してごみ容器 (示していない) へ処分される先端と尾端を有する両端のところで手で切断される。切断した葉は次に、ステンレスチール製のワイヤーメッシュの底を各々有するステンレスチールの多数のバスケット16のいずれか1つの中に覆まれる。次にこれらのバスケット16はステンレスチール製のトラックの中に置かれる。このトラックは台形のロート17の上部を形成し、もこのロート17によって黄色い液汁がバスケットを通して葉の底部から排液され、ロート17の底部に落下する。黄色い液汁は定期的に取り出され、貯蔵のために凝結される。黄色い液汁の排液の工程は約30分間かかる。

この工程の後、バスケット16の中にまだ残っている切断された葉は、台形のロート17に最も近接した位置で水浴

18に手で移される。向流の流れの中で水が台形ロート17から最も隔たった点において入口水パイプ19から浴18の中に入り、次に台形ロート17に最も近接した点で出口水パイプ20を通過して排出される。トレーは台形ロート17から遠ざかる方向に水浴中を手動で徐々に動かされ、バスケットが水浴18内に停まっている洗浄工程はおよそ1時間かかる。

洗浄後、バスケットは乾燥のためにトレー21の上に置かれ、これは僅か数分間継続する。ワイヤーメッシュ、黄色い液汁の排出および自動洗浄装置を含めて、バスケットに関する第4図のアッセンブリ全体はやはり、テキサス州グラスのナショナルシートメタル社によって特注製作された 316ステンレスチール製である。

洗浄後、トレイ21の上のバスケット16の中の覆まれた切断された葉は次いで、第5図に示すようにさらに切断してフィレットにするための領域に移動される。実質的に透明な材料だけが残るように、外皮22がフィレットから取り除かれる。外皮22の残部は捨てられる。次フィレットは粗粉砕機23に原料供給するトラフ23の中に置かれる。このトラフ23はテキサス州グラスのナショナル シート メタル社によってつくられた 316ステンレスチール製である。この粉砕機はモデルNo 5150 - N - シンク - イレーター (テキサス州グラスのワトソン フード サービス インダストリーズ社) (Watson Food Service Industries, Inc., Dallas, Texas) である。粉砕機23によって粗粉砕した後、この粉砕機から出てくる処理された材料A'は、316ス

テンレスチール製の垂直単殻タンクを有するおよそ100ガロンの容量をもつ可搬タンクE (テキサス州グラスのバントーン社を通して販売されているベルマ - サン製) (Perma-San, Manufacturer, distributed through Van Tons, Inc., Dallas, Texas) を通る。粗粉フィレットA'はベルマ - サン攪拌機 (モデルNo A A P H 2) (これもテキサス州グラスのバントーン社から販売されている) によってタンクE内で攪拌される。

粗均質化の後、タンクEからの物質は微細均一化および (任意的な) 濾過のための別途の領域に送られる。第6図においてタンクEからの材料は、オハイオ州クリーブランドのリライアンス エレクトリック社のリライアンス モーター モデルNo B 78 Q 2130 M - V F (Reliance Motor Model No B 78 Q 2130 M - V F of the Reliance Electric Company, Cleveland, Ohio) によって駆動されるポンプ28 (テキサス州グラスのクレパコ社 (Crepaco, Inc., Dallas, Texas) によって販売されているステンレスチール製の遠心ポンプモデルNo 4 V - 81) によって微細ホモゲナイザーE (テキサス州グラスのクレパコ社モデルNo 3 D D 13) にポンプ輸送される。微細均質化の後、この材料は 316ステンレスチール製の大きな1000ガロン垂直単殻混合タンクG (テキサス州グラスのバントーン社に販売されているベルマ - サン製) に送られる。微細に粉砕されたフィレットAはベルマ - サン攪拌機28a (テキサス州グラスのバントーン社から販売されているベルマ - サン製のモデル

No A A P H 2) によって攪拌される。タンクG中の材料Aは、これを取り出して、排気ライン28bを通るバルブの除去のためのフィルター27bを備えた1ユニットを形成するポンプ27aに送られることができる。ポンプ27aとフィルター27bはロマート珪藻土フィルター (テキサス州グラスのアレン リクリエーション社 (Allen Recreation Company) によって販売されているモデルNo 99 - 2138) の一部を形成している。濾過された材料は次にタンクHにポンプ輸送される。このタンクHはタンクEと同じようにふた25を備えることができる。

第7図において微粉砕されたフィレットAは、部分的に濾過され、ミキサー29によって攪拌され、ポンプ30によって造析器にポンプ輸送される。ミキサー29は、ベルマ - サン攪拌機 (テキサス州グラスのバントーン社販売のモデルNo A A P H 2) である。ポンプ30は、スベリアステンレスチール製モデルS C S 45プロセスポンプ (ウィスコンシン州デラバンのスベリアステンレス社製) である。プロセスポンプ30には4,450rpmのバンドーモーター製の3馬力のモーター30a (アーカンソー州, Fr. スミスのバルドーエレクトリック社のカタログNo C M 3559 T (Cat No. CM3559 T of the Baldor Electric Company, Ft. Smith Arkansas)) が取り付けられている。ポンプ30によってポンプ輸送された材料は、4個のフィルター31 (図示されていない) を有する造析ユニットJ (マサチューセッツ州ウォバーン, ロミコン社製のロミコンモデルH F 4 S S S 限外濾過システ

ム) (Romicon Model HF4SSS ultrafiltration system made by Romicon Inc., Woburn, Massachusetts) を通過する。各フィルターはフィルターハウジング32中に収容されている。材料は一部が分離ライン34を越えて分離排出ライン35に取り出され得るような地点まで垂直に通過する。その他の分離されなかった材料は、再循環送ライン33から透析装置に戻されるか、あるいは分離送ライン36を越えてバット1に戻され再循環される。

置かれているアロエの画分および求められている最終製品に依存して、所望の材料が加工の後に分離排出ライン35を通して、あるいはバット1の中で得られる。例えば過剰の水とミネラルが除去される必要がある場合には、小さなポアサイズの限外フィルターを用いて水とミネラルを分離し、ライン35を通して排出し、所望のアロエ画分をバット1に運送することができる。このプロセスは、所望の量の塩と水がバット1中に含まれる生成物から取り除かれるまで、この生成物を透析ユニットを通して単に循環することによって繰り返されることができる。このプロセスは2つ以上の透析工程を含むことができる。例えば先に説明したように、塩、低分子量の酸および非所望のアントラキノン類は第1透析工程で取り除くことができる。非所望の材料は分離排出ライン35から排出され、望ましい画分はバット1に戻される。この工程はロミコンから得られる10,000ダルトンのポアを有する限外フィルターを用いることによって行われる。次に10,000ダルトンの限外フィルターを同じ

くロミコン社から得られる50,000ダルトンの限外フィルターで置き換え、透析プロセスを繰り返す。この透析プロセスはここでゲルマトリクスポリマーを2つの画分に分離する。第1画分は10,000~50,000ダルトンのサイズのゲルマトリクスポリマーからなり、分離排出ライン35から排出され、第2画分はサイズが50,000ダルトンより大きいゲルマトリクスポリマーからなり、バット1に戻される。このプロセスは、与えられた生成物から取り出すことが必要とされる塩および水の量に依存して数分間ないし数時間にかわって継続することができる。

第7図において分離送ライン36は、テキサス州ダラスのテキサス ラバー サプライ社 (Texas Rubber Supply Company, Dallas, Texas) によって供給されるタイゴン (Tygon) チューブ (食品グレード) 型である。分離排出ライン35は、テキサス州ダラスのバントーン社販売の316ステンレススチール製パイプである。

残りのマトリクス細分部分は次いで処理されて、アロエベラ ゲル中の活性化化学物質であるアセマンナンを分離し、単離し、そして精製することができる。残りのマトリクス細分部分からアセマンナンを分離するために、過剰の水溶性低級脂肪酸極性溶媒を残りのマトリクス細分部分に添加する。するとアセマンナンはこの混合物から沈殿し始める。この溶液は、できるだけ多くの活性成分を溶液から沈殿させるのに十分であるが、アセマンナンが分解しはじめるほど長くはいけない時間、放置される。この時間の後、酸

静した沈殿物を乱すことなく上澄をデカントするかまたは吸い上げて除去する。次に沈殿物および残っている溶液を適当な遠心分離装置に入れ、沈殿物を集めてペレットにする。遠心分離後、上澄をデカントし、捨てる。所望ならば、このペレットを水溶性低級脂肪酸極性溶媒の新鮮なもので洗浄し、再び集め、上澄を再度捨てる。このペレットは次に凍結乾燥し、そして1晩乾燥を許す。得られた生成物はアセマンナンの典型的に非分解性の凍結乾燥形である。得られた生成物はすりつぶして粉末にすることができる。好ましくは、低級脂肪酸極性溶媒の添加に先立って、適当な酸をアロエ ベラ ゲルに添加する。除去を容易にするために、酸を加えてアロエ ベラ ゲル中に含まれるシュウ酸カルシウムを可溶化する。好ましくはシュウ酸カルシウム不純物を可溶化させるために十分であるが、アセマンナンポリマー鎖を分解しない濃度で酸を加える。

アセマンナンを分離し、かつ単離するために代わりうるそして好ましい方法は以下の工程を含む。

成熟した戸外で生育したアロエ ベラ植物からの葉を植物の根元に近いところから、引き抜くか切り取る。これは好ましくは処理に先立って葉のいかなる部分も損傷することなしに行なう。透明な細胞のゲルの漏出または黄色い液汁でのゲルの汚染を防止するために、葉は好ましくは茎のすぐ上の植物の根元で切り取り、茎から剥ぎ取る。

植物から除去した後、葉の尾端および先端部分を除去し、切り取った葉は分離プロセスにおいて上記したように、皮

を剥いでフィレットを形成させる。

得られたフィレット (内部ゲルマトリクス) を次に、すりつぶし、細断しまたはブレンドしてその内部に存在する間質繊維を破壊し、または内部ゲルマトリクスを液化のためにワイヤーメッシュもしくはフィルタースクリーンを強制的に通過させることができる。この得られた液化内部ゲルマトリクスを次に均質化する。かくして得られる均質化された抽出物は典型的には約4から約5、好ましくは約4のpHを有する。均質化された抽出物は次に濾過して間質繊維を除く。均質化され濾過された抽出物は次いで、すぐ前で述べた残りのマトリクス細分部分と同一の手法で処理してアセマンナンを分離し、そして単離することができる。

アセマンナンを分離しかつ単離するために別の代わりうるそして好ましい方法は以下の工程を含む。

成熟した戸外で生育したアロエ ベラ植物を植物の根元に近いところから引き抜くか切り取る。これは好ましくは処理に先立って葉のいかなる部分も損傷することなしに行なう。透明な細胞のゲルの漏出または黄色い液汁でのゲルの汚染を防止するために、葉は好ましくは茎のすぐ上の植物の根元で切り取り、茎から剥ぎ取る。

葉は次に適当な手段、例えばテキサス州ハーリング登のトンプソン マニファクチャリング社によって作られた「トンプソン アロエ押出機」 ("Thompson Aloe Extruder" made by Thompson Manufacturing Company, Harlingen, Texas) によって押しつぶされて、アロエ

ジュースを押し出すことができる。この押し出されたアロエジュースは次に、前に述べた残りのマトリクス細分部分と同一の手法で処理してアセマンナンを分離し、かつ単離することができる。

記載した方法のすべての工程は、好ましくは約-50℃で行なう凍結乾燥工程を除いて、ほぼ室温で行なわれる。

本発明の開示されたプロセスおよび組成物の種々の改変ならびに代替的改良、変形ならびに均等物は上記一般的な説明を読めばこの技術分野の当業者に明らかになるであろう。以下の実施例は単に例示的なものであって、このような改変、均等物もしくは変形をカバーする添付されたクレームの範囲を制限することを意図したものではない。

実施例 1

アセマンナンを分離及び単離するための工程

A. 予備的作業:

1. 予め清掃したタンク、ミキサーおよび付属器具類を50%イソプロピルアルコール(IPA)溶液で消毒し、熱い脱イオン水で濯いでIPAを除去した。
2. ポンプ及び付属のホースを5% "HTH" 塩素水溶液で濯いで洗い、次いで水を勢いよく流して洗った。
3. このポンプと付属のホースを50%イソプロピルアルコール溶液で消毒した。ポンプと付属のホースを熱い脱イオン水を用いてイソプロピルアルコールがなくなるまで勢いよく流して洗った。

の葉をロート状のステンレススチール製コレクターの頂部に一緒に配置した複数のステンレススチール製バスケット型コンテナの中に入れた。それぞれのコンテナはメッシュの底をもっている。黄色い液汁は、約30分間葉から排出することを許された。黄色い液汁はステンレススチールバスケットのメッシュ底を通過し、ロート状コレクターに集められた。

アロエの葉を入れているステンレススチール製バスケット型コンテナをコレクターから取り外し、次に第2のステンレススチール製容器に沈めた。この第2のステンレススチール製容器は上記のコンテナに対して向流に動く連続的に水平に流れる濯ぎ水の室温の水浴を含んでおり、前記コンテナは約30分間~1時間で前記容器の一端から多端まで手でゆっくり動かされる。このことは、黄色い液汁がさらに葉から排出することを許す。この葉は、この溶液に90分間浸漬されることを許した。

次に葉をこの溶液から取り出し、鋭いナイフまたはワイヤーチーズスライサーを用いてそれぞれの葉から外皮を除去して、それぞれの葉の部分からアロエゲルフィレットをつくる。このアロエゲルフィレットは目で検査され、特徴的な黄色い変色によって検出される何らかの汚染されたアロエゲルフィレットもしくはフィレット部分は捨てられた。汚染されていないアロエゲルフィレットの全体の量は、葉の大きさ及び条件に依存して、初めの葉の重量の20~80%であった。

4. ホモゲナイザーと付属ホース及びポンプを50%イソプロピルアルコール溶液で消毒した。このホモゲナイザーと付属のホースを熱い脱イオン水を用いてイソプロピルアルコールがなくなるまで勢いよく流して洗った。

リオグランデバレーから採集したアロエ バルバデンシス ミラーの葉を収穫した後、8時間以内に40~45°Fの冷蔵トラックに移し、処理するまで40~45°Fで冷蔵して分解を少なくした。

次に貯蔵した葉20~60ポンドを室温の次亜塩素酸カルシウムの水溶液の予備洗浴中に入れ、実質的に葉から表面の汚れを除去しかつ葉に付いた表面のバクテリアを殺した。次亜塩素酸カルシウムの水溶液は、1 galの水に90%次亜塩素酸カルシウムを約0.125 g 加えて遊離塩素50ppmを含む溶液をつくることにより調製した。葉は、予備洗浴中に約5分間滞留させた。

次に、実質的に汚れとバクテリアを含まない葉をテキサス州ハーリンガンのトンアソン マニュファクチャリング社(Thompson Manufacturing Company, Harlingen, Texas)製のトンアソンアロエウォッシャーの水平コンベアベルトの上に乗せた。このトンアソンアロエウォッシャーは、室温の水で葉を洗浄して葉から表面の汚れ及び次亜塩素酸カルシウムの水溶液を除去した。再びこの葉を視覚的に検査し、必要により手でこすって葉の表面に残存する表面の汚れを除去した。この葉を次に室温の水で濯いだ。

次に先端部分及び基部をそれぞれの葉から取り除き、こ

次に汚染されていないアロエゲルフィレットを、750座席のレストラン用のステンレススチール製屑処理ユニットに入れた。このユニットはフィレットを濃厚であるがしかし自由に流動する(粗均質化)液体のコンシステンシーをもつ平均粒子サイズまで粗砕した。このステンレススチール製の屑処理ユニットはN-シンク・イレイト・デビジョン オブ エマーソン エレクトリック社(N-sink-erator Division of Emerson Electric Co., Racine, WI)製のモデルNo S S - 150 - 13, シリアルNo 115132であった。

次にこの粗砕アロエゲルフィレットを100ガロンのステンレススチール製保持バットに移した。この保持バットはプロセスイクイップメント社(Process Equipment Corp., Belding, Michigan)製のモデルNo 100 ガロンOVC, シリアルNo 40865-3であった。

この保持バットから粗砕アロエゲルフィレット溶液をホモゲナイザーにポンプで輸送した。ホモゲナイザーはクレパコ フード イクイップメント アンド リフリジレーション社(イリノイ州シカゴ)(Crepaco Food Equipment and Refrigeration Inc., of Chicago Illinois)製のシリアルNo 04-03であった。このホモゲナイザーは、ミルクの均質化のために酪農プロセスにおいて一般的に使用されているタイプのものであった。粗砕アロエゲルフィレット溶液は、約1,500psiの圧力で微細に均質化された。

ホモゲナイザーから微細に均質化されたアロエゲル

フィレット溶液をステンレススチール製貯蔵タンクにポンプ輸送した。この貯蔵タンクは、プロセス イクイップメント社 (ミシガン州ベルディン) (Process Equipment Corp. of Belding, Michigan) 製のモデルNo 1000ガロンOVC, シリアルNo 40866-2であった。均質化されたアロエ ゲル フィレット溶液の全重量は、出発の葉の重量の20~80%であった。次に必要により、均質化した生成物を限外濾過を用いて透析した。

次に、微細に均質化されたアロエ ゲル フィレット溶液を、レスリー社 (Leslie) 製ダイアトマセアス アース フィルター (Diatomaceous Earth Filter) モデルDE-46を用いて濾過して、間質の繊維を除いた。けいそう土の代わりに該間質繊維自体が濾過媒体として用いられ、その繊維は、ナイロンメッシュ布のフィルター支持体によって支持される。十分な量の繊維が濾過媒体として役立つほどに蓄積することが出来るように、出口を開ける前数分間、ゲルをポンプでフィルターに通した。

次に、濾過したアロエ ゲル フィレット溶液20ガロンを、100ガロンのタンクにポンプで輸送し、190ブルーフ (proof) の未変成エタノール (エナル アルコール, 190ブルーフ, 米国薬局方 (U. S. P.), 最格な、U. S. イングストリアル ケミカルズ社 (U. S. Industrial Chemicals, Co., イリノイ州61953, タスコラ, 私書箱218) を通じて入手される、54ガロンのバッチ アイ ディー (Batch I, D.) #CT195 JO4) 80ガロンを、アロエ ゲル フィ

Products, テキサス州75050, グランドプレーリー, 私書箱1048) より入手される) を用いて回転させた。

遠心分離の後、上澄み液をデカントし、捨てた。次にそのペレットを新鮮な190ブルーフの未変成エタノールで洗い、再び2000×gで約10分間収集した。再度の回転の後、上澄み液を捨てた。

次に、そのペレットをいくつかの600 mlのバーチス (VIRTIS) 凍結乾燥ジャーに移し、液体窒素中で凍結するまで回転させた。この凍結乾燥ジャーを次に、ウェルチ デュオ-シール (Welch Duo-seal) 真空ポンプ (モデルNo 1402, サージェント-ウェルチ (Sargeant-Welch, テキサス州75235, グラス, 私書箱35445) より入手される)、バーチス液浸コイル冷却器 (Virtis Immersion Coil Cooler, モデルNo 6205-4350, クーラー, アセトン浴中) 及びバーチス18ポート真空ドラム マニホールド (Virtis 18 Port Vacuum Drum Manifold, モデルNo 6211-0350) から成る凍結乾燥装置に取り付けた。バーチス社の装置は全て、アメリカン サイエントフィック プロダクツ社 (American Scientific Products, テキサス州75050, グランドプレーリー, 私書箱1048) より入手される。凍結乾燥ドラムは、-50℃に保持したアセトンで満たされた。

そのサンプルを終夜、乾燥するまで凍結乾燥し、次にメトラ-エーイー (Mettler AE) 163の天秤で計量した。残ったサンプルは、本質的に変質しない、凍結乾燥されたカリシン (登録商標) から成る。アロエ ベラ ゲル20ガ

レット溶液に加えた。その溶液を、プロセス イクイップメント社 (Process Equipment Corp., ミシガン州ベルディン) 製ベルマ-サン (Perna-San) プロペラ攪拌機 (モデル# A A P G F - 4 A) を用い、20~30分間攪拌した。

次にそのアルコール-ゲル溶液を、直ちに、いくつかの直径10.5インチ、高さ8インチ、18-8ステンレススチール製の11フートのパン (ブルームフィールド イングストリーズ社 (Bloomfield Industries Inc., イリノイ州シカゴ) 製、ワトソン フード サービス イクイップメント アンド サプライズ社 (Watson Food Service Equipment and Supplies, テキサス州ダラス, ハーガーウェイ3712) より入手される) に移した。

アルコール-ゲル溶液を、次に約4時間沈降させた。

次に、透明液状上澄みを、パンの底に沈降した沈降物をかき乱さぬよう注意しながら、デカントし、または吸い上げた。次に、沈降物及び残った溶液を、4つの、1バイントのステンレス鋼製遠心分離バケツ (buckets) に、それぞれのバケツに沈降物及び残った溶液が約500g移されるように移した。次にバケツを2000×gで約10分間、アイイーシー セントラ-7遠心分離機 (IEC Centra-7 Centrifuge, インターナショナル イクイップメント社 (International Equipment Co., マサチューセッツ州02194, ニーダムハイツ, 2番街300) 製、アメリカン サイエントフィック プロダクツ社 (American Scientific

ロンからの収量は、カリシン約145~155gであった。

実施例 2

アセマンナンを分離及び単離するための工程

リオグランデバレーから採集したアロエ バルバデンシス ミラーの葉を収穫した後、8時間以内に40~45° Fの冷蔵トラックに移し、処理するまで40~45° Fで冷蔵して分解を少なくした。

先端部分及び基部をそれぞれの葉から取り除いた。次に鋭いナイフまたはワイヤーチーズスライサーを用いてそれぞれの葉から外皮を除去して、それぞれの葉の部分からアロエ ゲル フィレットを作った。

次にアロエ ゲル フィレットを、750座席のレストラン用のステンレススチール製の屑処理ユニットに入れた。このユニットはフィレットを濃厚であるがしかし自由に流動する (粗均質化) 液体のコンシステンシーをもつ平均粒子サイズまで粗砕した。このステンレススチール製の屑処理ユニットは、N-シンク-イレイター-デビジョン オブ エマソン エレクトリック社 (N-sink-erator Division of Emerson Electric Co., Racine, WI) 製のモデルNo SS-150-18, シリアルNo 115192であった。

次にこの粗砕アロエ ゲル フィレットを 100ガロンのステンレススチール製保持バットに移した。この保持バットはプロセス イクイップメント社 (Process Equipment Corp., Belding, Michigan) 製のモデルNo 100 ガロンOVC, シリアルNo 40866-5であった。

この保持バットから粗砕アロエ ゲル フィレット溶液をホモゲナイザーにポンプで輸送した。ホモゲナイザーはクレパコ フード イクイップメント アンド リフレーション社 (イリノイ州シカゴ) (Crepaco Food Equipment and Refrigeration Inc., of Chicago, Illinois) 製のシリアル№04-03 であった。このホモゲナイザーは、ミルクの均質化のために畜産プロセスにおいて一般的に使用されているものであった。粗砕アロエ ゲル フィレット溶液は、約1,500psiの圧力で微細に均質化された。

ホモゲナイザーから微細に均質化されたアロエ ゲル フィレット溶液をステンレススチール製貯蔵タンクにポンプ輸送した。この貯蔵タンクは、プロセス イクイップメント社 (ミシガン州ベルディン) (Process Equipment Corp., of Belding, Michigan) 製のモデル№1000ガロン O V C, シリアル№40886-2であった。均質化されたアロエ ゲル フィレット溶液の全重量は、出発の葉の重量の20~80%であった。次に必要により、均質化した生成物を限外濾過を用いて透析した。

次に、均質化されたゲルを、レスリー社 (Leslie) 製ダイヤトマセアス アース フィルター (Diatomaceous Earth Filter) モデル D E - 48を用いて濾過し、間質の繊維を除いた。けいそう土の代わりに該間質繊維自体が濾過媒体として用いられ、その繊維は、ナイロンメッシュ布のフィルター支持体によって支持される。次に、十分な量の繊維が濾過媒体として役立つほどに留積することが出来るように、

トのステンレススチール製遠心分離バケツ (buckets) に、それぞれのバケツに沈殿物及び残った溶液が約500g 移されるように、移した。次にバケツを2000×gで約10分間、アイイーシー セントラ - 7 遠心分離機 (IEC Centra-7 Centrifuge, インターナショナル イクイップメント社 (International Equipment Co., マサチューセッツ州 02184, ニーダムハイツ, 2番街300) 製、アメリカン サイエнтиフィック プロダクツ社 (American Scientific Products, テキサス州75050, グランドブレイリー, 私書箱1048) より入手される) を用いて回転させた。

遠心分離の後、上澄み液をデカントし、捨てた。次にそのペレットを新鮮な100ブルーの未変性エタノールで洗い、再び2000×gで約10分間回転した。再度の回転の後、上澄み液を捨てた。

次に、そのペレットをいくつかの 800ml のバーチス (V I R T I S) 凍結乾燥ジャーに移し、液体窒素中で凍結するまで回転させた。この凍結乾燥ジャーを次に、ウェルチ デュオ - シール (Welch Duo-seal) 真空ポンプ (モデル№1402, サージェント - ウェルチ (Sargent-Welch, テキサス州75285, グラス, 私書箱55445) より入手される)、バーチス 液浸コイル冷却器 (Virtis Immersion Coil Cooler, モデル№B205-4350 クーラー, アセトン浴中) 及びバーチス18ポート真空ドラムマニホールド (Virtis 18 Port Vacuum Drum Manifold, モデル№B211-0350) から成る凍結乾燥装置に取り付けた。バーチス社の装置は

出口を開ける前数分間ゲルをポンプでフィルターに通した。

次に、濾過したゲル20ガロンを、100ガロンのタンクにポンプで輸送し、100ブルーの未変性エタノール (エチル アルコール, 100ブルー, 米国薬局方 (U. S. P), 厳格な、U. S. インダストリアル ケミカルズ社 (U. S. Industrial Chemicals, Co., イリノイ州61953, タスコラ, 私書箱218) を通じて入手される、54ガロン バッチアイディー (Batchl.D.) # C T 185 T 04] 80ガロンを、アロエ ゲル フィレット溶液に加えた。その溶液を、プロセス イクイップメント社 (Process Equipment Corp., ミシガン州ベルディン) 製ペルマ - サン (Perma-San) プロペラ攪拌機 (モデル# A A P G F - 4 A) を用い、20~30分間攪拌した。

そのアルコール - ゲル溶液を、次に、直ちにいくつかの、直径10.5インチ、高さ8インチ、18-8ステンレススチール製の11クオートのパン (ブルームフィールド インダストリーズ社 (Bloomfield Industries Inc., イリノイ州シカゴ) 製、ワトソン フード サービス イクイップメント アンド サプライズ社 (Watson Food Service Equipment and Supplies, テキサス州ダラス, ハーガーウェイ3712) より入手される) に移した。

アルコール - ゲル溶液を、次に、約4時間沈降させた。

次に、透明液状上澄みを、パンの底に沈殿した沈殿物をかき乱さぬよう注意しながら、デカントし、または吸い上げた。次に、沈殿物及び残った溶液を、4つの、1バイン

全て、アメリカン サイエнтиフィック プロダクツ社 (American Scientific Products, テキサス州75050, グランドブレイリー, 私書箱1048) より入手される。凍結乾燥ドラムは、-60℃に保持したアセトンで満たされた。

そのサンプルを終夜、乾燥するまで凍結乾燥させ、次にメトラー エーイー (Mettler AE) 168の天秤で計量した。残ったサンプルは、本質的に変質しない、凍結乾燥されたカリシン (登録商標) から成る。アロエ ペラ ゲル20ガロンからの収量は、カリシン約145~165gであった

実施例 3

カリシスを分離及び単離するための標準的な実験室規模のプロセス

約50ポンドのアロエ バルバデンシス ミラーの葉を水で洗いそしてこすって、汚れた乾燥したラテックスとその他の汚染物を除去した。次にそれぞれの葉の外皮を除去し、フィレット全体を大きなピーカー (氷上) に入れた。

1.5 リットルバッチでアロエ フィレット全体をワーリング ブレンダー (Waring blender) にかけた。フィレットを室温で2分間高速で2回ブレンダーした。このブレンダーしたフィレットを次に4℃に冷却してブレンダー操作中に発生した泡を消失させた。

次にこのブレンダーしたアロエジュースを4層のコットン (クリーブランド コットン) に通して濾過して繊維質のセルロース系バルブを除去した。次に濾過液を6層のコットンに通過させ、約4リットルのアロエジュースを集めた。

次にこのアロエジュースを大きな5ガロンのステンレススチール製コンテナに入れた。この濾過したジュースに、10リットルの冷却したエタノール（フィッシャーエタノール試薬級 Cat. No. A985）を加えた。このエタノールは、アロエジュースを攪拌しながらゆっくり加えた。綿状の析出物が形成された。混合物を15～30分間攪拌し、室温で約2時間静置した。

次に上澄み液をデカントして除き、ペレットを小さなブレンダーに入れ、このブレンダーに1リットルの脱イオン水を加えた。この混合物を低速で数分間ブレンダーでペレットを洗浄し、次いで8リットルのナルゲン（nalgene）コンテナに入れた。この混合物にさらに4リットルのエタノールを加え、混合物を30分間攪拌した。生成した析出物を約2時間沈降させた。

上澄み液の大部分をデカントして除き、得られたペレットを室温で20分間2000×gで遠心分離して、残りの溶媒をデカントし、蒸発させるために析出物をペレット化した。

次にこのペレットを凍結乾燥フラスコに入れ、バーチス凍結乾燥機中で1晩凍結乾燥した。

凍結乾燥された粉末の重量は10.9gであった。収率は0.273%すなわち $2.73 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$ であった。

実施例 4

アロエ ベラ 中抽出物（アセマンナン）中のシュウ酸カルシウム夾雑物の減少

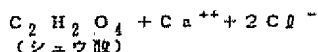
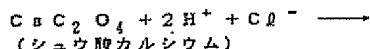
アロエ ベラ ゲルからアルコールによってアセマン

ナンを抽出する工程の間に、少量の有機及び無機物質が生成物と共に共沈降するのが認められる。無機塩の大部分で、しかもアロエ ベラ ゲルからのアセマンナンのアルコールでの抽出における更に主な夾雑物は、シュウ酸カルシウムである。シュウ酸カルシウムの存在は、光学顕微鏡、赤外線スペクトル及び熱重量分析より認められる。シュウ酸カルシウムの量はバッチごとに変化し得るものの、全抽出物の約30重量%を成すシュウ酸カルシウムが認められた。実施例4に記載された工程の目的は、アセマンナン中のシュウ酸塩含量を減少させることである。シュウ酸カルシウムは、水及びアルコール中で非常に溶けにくい。アロエ ゲルをアルコールで処理することにより、カリシン沈降物中のシュウ酸塩が濃縮される。このシュウ酸塩の濃縮は、シュウ酸塩のカルボニル非対称濃縮に起因する $1800 \sim 1587 \text{ cm}^{-1}$ の間のカリシンの強い赤外光吸収、及びその熱重量分析によるカリシンの高い灰分含量によって明示される。アセマンナンはカリシン中の活性物質であるので、生成物の品質の一貫性及び健康に関する理由のために、シュウ酸カルシウムのような無機塩は除去または少なくとも最少限とすべきである。

シュウ酸塩及び他の無機塩を分離するための一つの方法は、膜透析によるものである。しかしながら、この方法は多くの欠点及び不利益を有する。この方法は、粗製カリシンを再水和し、アルコールで再抽出し、再び凍結乾燥しなければならないので、時間を非常に浪費する。非常に重

要なことに、透析段階で生成物が保存されなければ、細菌による劣化及び腐敗が、非常に不活性なカリシンを生じるであろう。

一般に、カルボン酸塩は薄い鉱酸で処理すると、それらの対応する酸に転化する。シュウ酸カルシウムを塩酸で処理することにより、シュウ酸及びシュウ酸のカルシウム塩が、次の機構に従って生じるであろう。



シュウ酸は水及びアルコールに非常に良く溶け、それ故水／アルコール混合物中に優先的に抽出される。その結果、カリシンは、はるかに少量のシュウ酸塩及び他の無機塩を有する。

あらかじめ500psiで均質化され、新しい水泳プールフィルターを通して濾過した、約2ℓのアロエ ベラ ゲルを本実施例のために収集した。ゲルの初pHは攪拌後に測定した。重量推定のゲルサンプルをいくつかの800mlのビーカーに入れ、適当な酸、ここでは希硫酸（好ましくは6N硫酸）、または濃水酸化ナトリウム溶液で、pHを適当に次のように調整した。

サンプルNo.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
重量 (g)	100.0	100.0	99.9	100.0	100.0	99.7	100.0	99.9	99.5
pH	4.58	4.07	2.45	3.98	5.08	10.6	8.16	7.0	8.58

各サンプルのpHを調整した後、4体積のSDA-3Aエタノールを、ゲルが規定のpHのもとにいる時間を最小限にするために、できるだけ早く加えた。混合物の2分間未調の攪拌の後、各混合物を約3～4時間放置した。次に各抽出物を遠心分離し、凍結乾燥し、種々のpH条件下での収率を測定するため、秤にかけた。

九つの固体のカリシンサンプルの赤外光スペクトルは、適量の物質を臭化カリウム中に混合することによって作られたディスクより得られた。各ディスクに、アイビーエム（IBM）製フーリエ変換赤外分光計（FT-IR spectrometer）にて、 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ （波数）の走査を行った。種々のpH条件下でのカリシンサンプルのスペクトルは、定量的に比較された。

熱重量分析

カリシンの熱的な重量損失は、明確な指紋特性を有する。各サンプル約10mgを、メトラ（Mettler）熱分析機にて、25℃から780℃へ、20℃/分の速度で加熱した。温度が600℃に到達するまでは窒素ガス雰囲気、引き続き780℃までは酸化条件を使用し、次に各サンプルがこの温度に2分間止まることを許した。重量損失温度分析図より、含

水率、炭水化物、酸化され得る炭素骨格、シュウ酸塩及び灰分の含量が求められた。

結果と考察

カリシンの酸処理で最も重要な要素は、物質の物理化学的特性が、この工程によって不利な影響を受けたかどうかである。適当な酸が選択されなければならない：(i) 合理的な量にて適当な pH 範囲（約 8.0～約 8.5）を達成することが可能な酸、(ii) 有益な成分（多分散系アセマンナン）、溶媒混合物（エタノール）及び収容する容器及び装置と不利な反応をしないであろうもの、及び (iii) 更に、アセマンナン膜を造成しないような濃度で選択される。多くの薄い硫酸及び高濃度の有機酸が適当であるが、非酸化性硫酸が、エステル及び減成が最少限となるので、最も適当である。適当な酸、例えば 6 N 硫酸を選択すれば、不利な影響を受けるよりむしろ、カリシンの特性がより低い pH 条件にてかなり向上するようである。例えば、同じ濃度（重量/体積）のカリシンは、酸で処理すると、より粘潤な再水和された溶液を与える。粘潤な溶液は、良い生成物を意味する。溶液のサイズ排除クロマトグラフィーによる分離は、非処理のカリシンと同じクロマトグラフ特性を示す。それ故、使用した条件下で、減成は観察されなかった。

次の結果は、ゲルの単位重量中の全固形分で表されるカリシンの収率は、酸処理の後に減少すると言うことを示す。

サンプル No	0	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	4.55	4.07	2.45	8.85	5.09	10.56	8.10	7.0	8.68
収率 (%)	0.20	0.22	0.12	0.14	0.27	0.23	0.25	0.26	0.24

しかしながら、赤外線スペクトル及び熱重量分析による生成物の続く分析は、その高い収率がシュウ酸塩及び灰分含量に明らかに関係していたことを示す。

赤外線スペクトルは広く、カリシンの定性的及び定量的特徴付けの両方に用いることが出来る。より低い pH でのカリシンの、約 1740 cm^{-1} に位置するアセチル基の吸収ピークの増大、及び約 1590 cm^{-1} のシュウ酸塩のピークの減少は、シュウ酸塩含量の減少を明示する（第 8 図）。

熱重量分析は温度と重量損失の特徴的なプロファイルを与える。一般に、純粋なカリシンは示差熱重量分析において、三つの主要なピーク：(a) 水分 80～100℃、(b) 炭水化物（アセマンナン）200～400℃、及び (c) 酸化され得る炭素骨格 600～680℃を示す（第 9 表）。一方、例えばシュウ酸カルシウムで汚染されたカリシンは、高い灰分含量による 450～600℃及び 650℃～720℃に位置するさらに二つのピークを示す（第 10 表）。

下記の第 1 A～E 表は、種々の pH 条件でのカリシンの熱重量分析結果を示す。

第 1 A 表
カリシンの熱重量分析結果 (pH 4.50)

サンプル ID	重量 (mg)	H ₂ O (%)	残分 (%)	炭水化物 (%)	シュウ酸塩	
					425 540°C	631 750°C
70802	9.7220	0.8122	17.8940	49.9485	10.8880	12.14
70807	8.8020	8.6803	18.0750	51.1364	9.7804	11.84
70811	10.1150	6.7721	18.8030	51.8980	8.8604	11.98
70812	9.1790	8.6847	18.4830	52.4889	8.7700	10.89
70813	8.9810	5.2687	18.5390	53.0124	8.9522	10.85
70814	9.4590	4.7287	18.5180	52.0994	9.4785	12.18
70816	9.6000	5.4271	17.7810	52.5517	9.1771	12.10
70820	9.9120	5.6094	17.0800	54.7322	8.8259	10.82
平均 (X)	9.4705	6.0089	18.0873	52.1709	9.2211	11.49
標準偏差 N=8	0.4570	0.8391	0.0325	1.4205	0.6087	0.65

第 1 B 表
カリシンの熱重量分析結果 (pH 3.60)

サンプル ID	重量 (mg)	H ₂ O (%)	残分 (%)	炭水化物 (%)	シュウ酸塩	
					425 540°C	631 750°C
70315	9.2100	6.9164	7.7959	72.4104	5.6243	4.082
70321	10.7180	6.5777	9.0035	70.1716	6.4751	4.879
70323	9.3070	6.0277	7.0295	73.5680	5.1467	3.900
70324	9.0919	5.2600	0.0739	74.6780	5.0820	3.707
70326	9.6950	7.0397	10.1080	70.0355	6.4079	5.790
70327	9.1490	5.7493	9.5639	69.4942	6.0455	5.224
70328	9.4680	5.5450	8.3333	68.0317	9.5802	4.393
70329	9.3140	6.4204	0.6859	71.0130	5.5937	4.402
平均 (X)	9.4940	6.1939	8.5491	71.3503	6.3307	4.548
標準偏差 N=8	0.5303	0.6478	1.0118	2.0730	1.4527	0.708

第 1 C 表

カリシンの熱重量分析結果 (pH3.20)

サンプル ID	重 量 (mg)	H ₂ O (%)	残 分 (%)	炭水化物 (%)	シュウ酸塩	
					425 540C	631 750C
70330	9.3200	3.5514	6.2621	77.1819	5.7152	3.506
70331	9.8330	4.6273	4.5764	80.7280	4.9425	1.871
70334	10.8360	6.1831	5.0388	77.0395	4.8819	2.085
70401	8.1040	7.8195	4.8018	80.3070	4.9975	2.023
70402	9.0650	4.0927	4.6222	79.4380	8.8285	1.522
70403	9.9490	4.2014	4.3220	80.1990	4.7945	2.472
70405	8.8930	6.0497	4.6353	79.1638	4.4305	2.009
70406	9.8350	4.3213	4.0874	80.9150	4.7788	1.9420
70419	9.0080	5.3619	2.1758	81.8822	4.7059	1.7651
70423	9.8510	8.6988	3.9285	79.8803	4.7102	2.0508
70428	9.7880	5.5885	4.1479	78.8307	3.8947	1.2073
70427	10.1010	6.7815	3.2670	79.5860	4.5144	2.0190
70428	10.7790	3.6181	2.6089	80.1190	4.4717	2.7388
70431	9.9030	5.9681	4.1099	78.4407	4.5542	2.3831
70433	8.3980	6.2277	3.5127	79.5073	4.5844	2.2982
70434	9.7360	7.1385	4.0188	77.1878	4.5804	2.5781
70440	10.0850	5.3148	3.1730	81.4331	4.4522	1.9534
70442	8.9470	8.2833	3.3779	81.0805	4.4234	1.2567
70504	9.9740	0.2933	4.7925	77.1410	4.7323	2.8173
70505	9.1440	5.9165	3.0308	80.5337	4.4182	1.4545
70506	10.2590	5.5659	3.4214	78.8573	5.9460	1.9300
70514	10.2000	7.7408	5.5164	74.4401	5.2714	4.0856
平均 (X)	9.6827	5.7172	3.8581	79.2950	4.8504	2.2145
標準偏差 N=22	0.0851	1.2332	1.3388	1.7546	0.6198	0.6831

第 1 D 表

リサイクルされたカリシンの熱重量分析結果 (20分間攪拌)

サンプル ID	重 量 (mg)	H ₂ O (%)	残 分 (%)	炭水化物 (%)	シュウ酸塩	
					425 540C	631 750C
70515	9.8270	0.9401	8.4739	88.5359	6.0141	8.4109
70518	9.0530	5.5059	5.3753	76.3485	5.0638	2.8041
70519	10.4880	3.4134	8.1998	88.3159	5.9407	8.4838
70523	9.5570	3.2855	6.0013	60.6212	5.9642	7.3663
70526	9.8250	5.8321	8.1829	74.7279	4.8851	3.1959
平均 (X)	9.9300	4.9554	7.6028	70.9999	5.5714	5.2902
標準偏差 N=5	0.3437	1.5844	1.5011	4.3270	0.5990	2.0401

第 1 E 表

リサイクルされたカリシンの熱重量分析結果 (40分間攪拌)

サンプル ID	重 量 (mg)	H ₂ O (%)	残 分 (%)	炭水化物 (%)	シュウ酸塩	
					425 540C	631 750C
70528	9.6900	5.7069	8.1197	77.7105	4.7878	2.833
70529	9.2960	7.0998	4.9699	75.8714	4.5611	3.001
70535	9.7970	8.5428	4.3483	78.3609	4.2462	1.194
平均 (X)	9.5943	6.4498	5.1460	77.6500	4.5250	2.182
標準偏差 N=3	0.2638	0.7011	0.8987	1.7457	0.2627	0.922

これらの表は、下記を示している：

1. 4.58を超えるpHを有する出発ゲルより作られたカリシンは、それぞれ52.2%及び18.1%の平均総炭水化物及び残分（灰分）含量を示した。

2. 出発ゲルのpHを約4.58から3.00に調整すると、炭水化物及び灰分含量はそれぞれ71.4%及び8.55%であった。これはそれぞれ測定されたパラメータについて、88.8%及び52.8%の改善である。

3. しかしながら、pH3.20では、平均炭水化物含量が79.3%にはね上がっている一方で、灰分含量は3.86%に減少しており、炭水化物が約51.2%増加し、灰分が78.7%減少していることを示す。

4. 予備的データは、増加した炭水化物含量とより低い灰分量を有するカリシンのパッチがより良い抗ウイルス活性を示したことを示す。それ故、処理は8.00と3.50の間のpHにて行うことが推奨される。

第 2 表

カリシンの品質に対するpHの影響 (TGA法)

pH	2.45	3.35	4.07	4.58	5.09	6.10	7.00	8.68
水分	6.8782	8.2483	8.9750	8.4035	8.5905	8.8431	8.9819	9.7702
アセマンナン	78.925	69.930	46.020	38.851	37.649	36.796	36.698	38.316
炭素骨格	17.812	15.455	12.840	12.846	12.969	12.508	11.485	10.769
シュウ酸カルシウム	0.4890	4.9180	9.7985	10.870	10.261	10.347	11.725	10.148
灰分	1.8044	3.0494	13.811	15.989	16.847	17.908	17.182	17.188
収率 (%)	0.12	0.14	0.22	0.26	0.27	0.25	0.28	0.24

カリシン（全固形分）収率、シュウ酸カルシウム、灰分含量及び水分は、pHが4〜5に上昇すると共に増加するように見える。しかし、アセマンナン及び対応する炭素骨格は、pHが下ると共に増加する。それ故、もし灰分及びシュウ酸カルシウム含量を減少すべきであるなら、4.0より高いpHは推奨されない。0.2%より高いカリシンの収率は、シュウ酸カルシウム汚染について分析されねばならない。

アロエベラゲルを適当な酸、例えば薄い硫酸、好ましくは塩酸で処理してゲルのpHを8.0〜8.5の間に調整し、続いてエタノールで抽出することは、シュウ酸塩の量の有意な減少をもたらす。この工程により、シュウ酸カルシウム及び灰分含量の両者を、80%より多い程度だけ減少し得る。この処理はまた、物理化学的分析方法によって示され

たように、ポリマーの分解を伴うことなく、活性カリシンの量を濃縮する。

カリシンのバッチ二つを、実施例1の記載のようにして、但し、エタノールによる沈殿に先立ち、pH3.6に酸性化する追加的工を用いて、作った。#70815のロット中で、均質化されたアロエ ベラ ゲル20ガロンに硝酸 (81ml) を加えた。#70821 のロット中で、均質化されたアロエ ベラ ゲル45ガロンに濃塩酸 (171ml) を加えた。収量はそれぞれ55.8g (0.07%) 及び 188.0g (0.11%) であった。IR及びTGAによる化学的分析は、両バッチが似かよった品質及び減少したシュウ酸カルシウムを有することを示した。これら二つのバッチの分析結果は、第1B表中に含まれている。

硝酸は、塩酸または他の任意の適当な酸と同様、専ら脱水性のために用い得ると言うことが、当業者に明らかとなったであろう。

カリシンの特徴付け

原料のスクリーニング技術を用い、アロエ ベラより抽出されたポリサッカライドが、アロエ ベラ中の活性化学物質であることが今、見出された。このポリサッカライドを以下、アセマンナンと呼ぶ。アセマンナンは実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの、秩序正しい線形ポリマーである。他の成分、例えばタンパク質、有機酸、アントラキノン類、ビタミン及びアミノ酸は、カリシンの1%より少ない量を構成する。アロエ ベラ中のカリシンの濃

度は、アロエ ベラ ジュースの約0.05~0.3重量%であることが見出された。収率又は液中のカリシンの濃度は、葉の成熟度に依存する。

アセマンナンがアロエ ベラ中の活性化学物質であることを証明する薬理学的データは、次のように要約することができる。

1. アセマンナンの投与量-効果 (dose-response) は、等量のアセマンナンを含むアロエ ベラジュースと同じであった。
2. アセマンナンは、さまざまな投与ルートすなわち静脈内、腹腔内および経口投与によって潰瘍保護モデルにおいて有効であった。
3. アセマンナンは、薬理学的モデルの両者における効果の100%を成す。
4. 全く異なる源、コンニャク (konjac) 植物からのアセマンナンに類似する物質である化学物質グルコマンナンは、いくつかの薬理学的作用を示した。

カリシンは、やけど、潰瘍その他皮膚及び胃腸管壁の創傷の治療に対して関係することが知られている組織培養における繊維芽細胞の複製を48時間で800%まで増加することが実験室の研究で示された。

カリシンはまた、繊維芽細胞の核中のDNA合成を増加することが示された。そしてDNA合成の増加は、治癒プロセスにおける基礎的なステップである代謝活性及び細胞複製の速度を大きくする。

カリシンは動物の治療速度を増大することが解明された研究において示された。

カリシンはまた、動物の研究において胃潰瘍の有効な治療剤であることが示された。その胃がヒトの胃と同様に反応する実験室用ラットが3年間に亘って試験された。カリシンは、胃潰瘍の治療に使用されている現在の医薬と同様もしくはこれより優れていることが見出された。このような製品の多くのものは、胃内の塩酸を抑制するように作用する。カリシンは異なる原理に基づいて作用し、消化液の自然の流れを変えるものではない。

上記の通り、カリシンは、酸化したアロエ ベラ ゲルに水溶性低級脂肪酸塩性溶液、好ましくはエチルアルコールを加えることによって析出させることができる。カリシンの粉末は次に凍結乾燥することによってつくることができ、所望により、この凍結乾燥製品をモウリネックスコーヒングラインダー (テキサス州ダラスのジラーズ (Dillard's) から入手できる) のような粉砕装置を用いて粉砕し粉末にすることができる。カリシンの粉末は、高度に静電性であり、何らかのアントラキノン夾雑物の酸化状態に依存して黄ばんだ白色からピンクないし紫色の無定形粉末である。カリシンは、加水分解を引き起こす水を除去する凍結乾燥によって安定化され実質的に非分解性となる。所定量のカリシンを含む凍結乾燥されたアロエ ベラ ゲルは、その有効性を2年間保持した。凍結乾燥した形のカリシンは10年まで安定であると考えられる。

粉末化したカリシンの製造において熱と時間が重要なファクターであることがわかった。熱はカリシンの加水分解もしくは分解を助長し、所定の温度におけるカリシンの加工時間が長くなればなるほど分解が多くなる。従って、高分子量のカリシン粉末が望ましい場合には、アロエ ベラの葉全体からカリシンを最も早く抽出することができるプロセスを使用することが好ましい。低分子量のカリシン粉末が望ましい場合には、アロエ ベラの葉全体からカリシンを最もゆっくり抽出することができるプロセスを使用することが好ましい。

0.2~1%の重量/容量濃度のカリシン粉末を再水和すると、新鮮なアロエ ベラのような粘弾性「ゲル」が再び形成された。カリシン粉末の再水和によって復帰するこのゲルのようなコンシステンシーは、カリシンの高分子量ポリサッカライドの性質を示している。一般に、ポリサッカライドは分解または加水分解されるとその粘度が低下する。従って、再水和したカリシン粉末の粘度が品質の優れた表示を与え、品質保証のパラメーターとして使用されることができる。

本発明のプロセスに従って製造されたカリシンは、実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの、好ましくは相互にβ (1→4) 結合によって結合された実質的に非分解性の凍結乾燥された線状ポリマーとして特徴付けることができる。

本発明の開示された組成物のさまざまな改変ならびに代

替的改変、変形及び均等物は上記一般的な説明を就めばこの技術分野の当業者に明らかになる。次の実施例（実施例5～8）は、カリシンをさらに特徴付けかつ同定するために行われた。以下の実施例は例示的なものであって、上記の改変、均等物もしくは変形をカバーする添付されたクレームの範囲を制限することを意図したものではない。

実施例 5

カリシンの分離、精製及び特徴付け

A. カリシンの分離

アロエの葉を洗浄、スライスして開き、切り分けた。汚れない内側のゲルを保持し、一方、緑色の外皮及び乳樹脂物質を捨てた。切り分けた物質を均質化し、フィニッシャーモデル75 (Finisher Model 75, FHC, イリノイ州シカゴ) で強く遠過し、バルブの殆どを除いた。その透明で粘稠なゲルを、希塩酸で約pH3.20に酸性化して、通常存在するカルシウム及びマグネシウムのシュウ酸塩及び乳酸塩を、それらの対応する水溶性の酸へと可溶化させた。次に酸処理したゲルを、過流速度にて四体積の95%エタノールで4～5時間抽出した。浮游している繊維を除去し、次にアルコール/水混合物を吸い上げ、一方、固形分沈澱物を遠心分離によって収集した。殆どの、アルコール/水に可溶性の物質例えば有機酸、オリゴ糖、単糖類、アントラキノン類及び無機塩が、この工程において除去された。次に固形分を新鮮なアルコールで洗浄し、遠心分離、凍結乾燥し、砕いて白い無定形の粉末とした。

C. 分子量測定

導入部:

アセマンナン (AM) は植物より抽出されるポリサッカライドである。このものは多分散であり、そのことはこのものが1より多い分子量サイズから成ることを意味する。

目的:

この研究の目的は、サイズ排除クロマトグラフィーにより、アセマンナンの分子量分布を測定することである。

試薬及び薬品:

0.05% アジ化ナトリウム

標準:

0.05% アジ化ナトリウム中、Pullulan 553K, 100K 及び12.1Kダルトンの各標準を 0.2% (重量/体積)

機器:

高速液体クロマトグラフィー、モデル590 (ウォーターズ アソシエーツ社 (Waters Associates, マサチューセッツ州ミルフォード) 製)

示差屈折計 (Differential refractometer) モデル1770 (バイオ・ラド社 (Bio-rad) 製)

検分計 SP 4290 (スペクトラ・フィジクス社 (Spectra-Physics) 製)

サンプルの調製:

テフロンで裏打ちしたキャップ付きのガラスびん (105×25mm) 中に、カリシン20mgを秤り取った。

0.05% アジ化ナトリウム10mlを加え、ジュニア オー

B. 精製

この段階におけるカリシンは、一般にタンパク質、単糖類、オリゴ糖及び無機塩によって汚染されている。これらの夾雑物は生成物の生物活性に影響を与えず、それ故、製造されたバルクの物質に対しては、さらなる精製は必要でない。しかしながら、カリシンの特徴付けにおけるさらなる工程として、さらなる精製工程を加えた。上述の夾雑物は、バルクの粉末をリン酸緩衝液に再溶解し、それを非特異的プロテアーゼ (シグマロット #5147) で処理し、続いて広範な透析によって除去することができる。その濾過不能な生成物 (このものは主にアセチル化されたポリマンノースである) を凍結乾燥し、第11図に示したように、赤外線スペクトル、熱重量分析 (TGA), HPLC, GLC及びGC/MSを包含する多くの分析法によって特徴付けた。

アロエ ペラ生成物の精製には、HPLC及びGCが推奨される。ガス液体クロマトグラフ (GLC) 法は、アロエ ペラ ゲル抽出物中のマンノースの分離及び定性に用いられる。生成物へのマンノースの混入を防ぎ、より高いアロエ ゲル含量を持つであろう製品を作るために、透析工程を加えても良い (分子量カットオフ12,000～14,000)。さらに、ローカスト豆ガム、グアーガムまたはグルコマンナンの混入は、マンノースに対するガラクトースまたはグルコースの高い比率によって感知される。

ビット振とう機 (Junior orbital shaker, ラブ・ライン インストラメンツ社 (Lab-Line Instruments, イリノイ州メルローズパーク) 製) 中で振りまぜる (4時間) ことにより、溶解した。

1.2μmメンブラン (Acrodisc (商標), ゲルマン サイエンス社 (Gelman Sciences) 製) を通して濾過。濾液をHPLC中への注入のために貯えた。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) 条件

カラム: Spherogel TSX 5000 PHHR (ベックマン インストラメンツ社 (Beckman Instruments) 製)

検出器: 示差屈折計 (Differential refractometer) (バイオ・ラド社製)

移動相: 0.05% アジ化ナトリウム

流速: 40℃で1 ml/分

注入量: 50μl

結果:

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、プルラン (Pullulan) ポリサッカライドを標準として測定すると、アセマンナンは、10,000ダルトンより大きいポリマーを少なくとも73%含む多分散ポリサッカライドである。第12図は、概知の分子量: それぞれ 553K, 100K 及び12.1Kダルトンのプルラン (Pullulan) 標準の、SECクロマトグラムを表す。対応するカリシンのクロマトグラムを第13図に示す。そのクロマトグラムでは、A, B, Cと標識された三本の主ピーク部分が極立っている。ピークAは

100,000 ダルトンより大きいアセマンナン画分を表し、ピークBは10,000ダルトンより大きいがしかし100,000ダルトンより小さい画分である。ピークCはより低い分子量の成分を表す。ピークA及びBの合計が、活性画分を構成する。

D. 赤外 (IR) 分光分析

導 入 部 :

アセマンナン (カリシンの活性な製品) の官能基は、特徴的な赤外振動数にて吸収する。赤外線スペクトルはそれ故、この物質を特徴付ける重要な方法である。

目 的 :

この研究の目的は、赤外分光法により、カリシンをさらに特徴付けることである。

試薬及び薬品 :

赤外等級の臭化カリウム (KBr) 粉末 [マリンクロット社 (Hallinckrodt Inc., ケンタッキー州バリ) 製]

機 器 :

IBM9000コンピュータ及びプリンター/プロッターを備えたIBMフーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光器モデルNo32

サンプルの調製 :

ウィリー ミル [Viley Mill, トーマス サイエントフィック社 (Thomas Scientific Co.) 製] 及び60メッシュサイズより小さい粒子を通過させるふるいにより、カリシンを微細な粉末に予備粉砕した。

予備粉砕したサンプル5mgを乾燥KBr 495mgと混合して、合計500mgの混合物とした。

その混合物を、メノウ乳鉢及び乳棒を用い、手で再び粉砕して、均一な物質とした。

代表的なサンプル (80~100mg) を、油圧ジャッキ (商標Valkor) を用い、40,000psiの圧力にてプレスして透明なディスクとした。

ディスクは4000 cm^{-1} から 400 cm^{-1} まで走査した。シグナル対ノイズの比を向上させるため、分解能4 cm^{-1} にてマルチ走査 (80走査) を行った。

結 果 :

第14図に示したスペクトルの分析結果では、次の特徴的な吸収ピーク振動数 (cm^{-1}) が極立っている。

波 数 (cm^{-1})	振 動 種
1088.8	ピラノース環構造のC-O伸縮
8422.1	O-H伸縮
1250.0	C-O-C伸縮 (アセチル基)
1740.0	C=O伸縮 (アセチル)
1877.3	C-H曲げ
1849.3	C=O伸縮 (アミドI)
530.6	内部回転モード他
599.9	内部回転モード他
2928.3	C-H伸縮
1641.3	N-H変形 (アミドII)
800.3	—
897.0	環上のC ₁ のアキシアルH
773.8	環の微動

カリシスのスペクトルは、約8422 cm^{-1} に、O-H伸縮に帰因する強い吸収を示すことが留意される。アセチル基のカルボニル及びC-O-C伸縮はそれぞれ1740及び1250 cm^{-1} 付近に位置する。C-O-C系の強いシングルバンドは、O-アセチル基がモノマー単位にエクアトリアルに結合していることを示す。水分の吸収ピーク及び約1641 cm^{-1} のN-H変形 (アミドII) 上に重なった約1849 cm^{-1} のアミドカルボニル伸縮 (アミドI) は、タンパク質/プロテオグリカン不純物に帰因する。

800~730 cm^{-1} の間の吸収バンドは、アセマンナンの成る立体化学的特徴と関連付けることができる。例えば、

844 cm^{-1} 付近のエクアトリアルC₁-Hに帰因するバンドがなく、897 cm^{-1} 付近のアキシアルC₁-Hが存在することは、環アセマンナンがB結合していることを示す。環の振動 (955 cm^{-1} のショルダー) 及び約773 cm^{-1} に位置する環の微動は、ペータ-グリコシド結合を持つD-マンナンを示す。

下の第3表は、強度に従って並べられた対応する吸光度を有するピーク吸収振動数を示す。

第 3 表

プロテアーゼ処理のカリシンのピーク吸光度振動数

ピーク№	ピーク	ピークの 初まり	ピークの 終り	吸光度
1	1066.8	1201.8	1049.4	0.546
2	8422.1	8433.7	8410.0	0.474
3	1250.0	1848.4	1201.8	0.439
4	1740.0	1821.0	1899.5	0.433
5	1377.8	1410.1	1350.3	0.343
6	1840.8	1897.0	1585.7	0.325
7	530.5	582.8	493.8	0.313
8	599.0	634.7	588.4	0.282
9	2928.8	2995.8	2809.4	0.242
10	1541.3	1651.8	1527.8	0.228
11	808.3	895.3	789.0	0.224
12	897.0	920.2	843.0	0.210
13	773.6	787.1	750.4	0.207

E. プロテアーゼ処理したカリシンの赤外線スペクトル

バルクのカリシンの赤外線スペクトルは、アミド I 及びアミド II ピークの存在によって示されるように、タンパク質またはプロテオグリカン不純物の痕跡を示す。タンパク質またはプロテオグリカンを加水分解する非特異的プロテアーゼ、引き続いての広範な透析による、バルク物質のき

らなる精製は、これらの不純物を除去した。

プロテアーゼ処理したサンプルのスペクトルを第15図に示す。このスペクトルの分析結果は、第14図のプロテアーゼ処理のカリシンと比べ、いくつかの相違を示す。例えば、第14図中の約1849及び1541 cm^{-1} に位置するアミド I 及びアミド II のピークは、プロテアーゼ処理したサンプルには存在しない。さらに、約1689.7に位置する水分の吸収ピークが、明確に分割されている。第4表は、プロテアーゼ処理したカリシンの数を強度に従って並べた対応する吸光度と共にピーク吸収振動数を次のように示したものである。

第 4 表

プロテアーゼ処理したカリシンのピーク吸光度振動数

ピーク№	ピーク	ピークの 初まり	ピークの 終り	吸光度
1	1064.8	1093.8	1049.4	0.988
2	1032.0	1045.5	970.3	0.988
3	8422.1	8485.8	8404.8	0.814
4	1246.1	1348.4	1201.8	0.720
5	1740.0	1888.4	1895.8	0.679
6	1377.3	1408.3	1350.3	0.593
7	530.5	545.9	493.8	0.575
8	596.0	677.1	586.4	0.532
9	1639.7	1895.8	1554.8	0.481
10	2928.3	2990.0	2903.2	0.428
11	897.0	918.2	887.4	0.409
12	808.3	835.3	790.9	0.409
13	771.8	789.0	748.5	0.387

吸光度の値は、定性的なものであり、また、サンプルディスクの製造において同じ温度を用いる企図がなされなかったため、第14図のプロテアーゼ処理のカリシンと強度を比較しえない。

赤外線スペクトルのみに基づけば、カリシンはO-アセチル基側鎖を有する、本質的にB結合したD-マンノース

のポリサッカライドである。N-アセチル基の存在はプロテイン/プロテオグリカン不純物に帰因するのであろう。

F. カリシンの熱重量分析 (TGA)

導入部:

熱重量分析 (TGA) は、ポリマーの研究のための重要な分析法である。温度変化の結果としてのポリマーの分解における重量損失は、そのポリマーに特徴的なものである。さらに、TGA は粉末化された物質の水分 (H_2O) 及び灰分含量の測定を助ける。

目的:

本研究の目的はTGAを用い、カリシンをさらに特徴付けることである。

試薬及び薬品:

なし

機器:

1. T C 10A 評価及び制御コンピュータ (Evaluation and Control Computer) と、M 3 - 03 ミクロ天秤を有する T G 56 炉とを特徴とする、メトラー熱分析機 (Mettler Thermoanalyzer) T A 3500 システム。

2. プリンター/プロッター、モデル M P 3 (Print Swiss Matrix) 型

3. ファイル記憶のための I B M P C

サンプルの調製及び分析:

70ml のアルミナルツボ中に、サンプル10mgを、ミクロ天秤にて、 $\pm 1 \mu\text{g}$ の精度で秤り取った。

第 5 表
カリシンのTGA分析結果

サンプルNo	重量 (mg)	H ₂ O %	灰分* %	アセマンナン %	CaOx %
1	9.4390	7.3631	3.8034	82.2119	2.5532
2	9.5860	7.3649	4.0163	81.8381	2.7540
3	9.5210	7.4992	4.2012	81.7568	2.9514
4	9.4530	7.7118	4.1786	81.2010	2.9820
5	9.4090	7.7691	3.8793	81.6072	2.9546
6	9.5960	6.8674	3.9912	82.0969	3.1576
7	9.4740	7.6209	4.1904	81.6065	2.8605
8	9.5730	7.3436	4.2411	81.0719	3.3218
9	9.5550	7.9435	4.1130	80.9652	3.2444
10	9.5220	7.7715	4.3373	80.8023	3.1611
平均値** (X)	9.5128	7.5255	4.0852	81.5238	2.9920
標準偏差	0.0628	0.3087	0.1688	0.4864	0.2353

* 該灰分含量は、Ca(1.51), Si(0.1), Na(0.55), Mg(0.37), Fe(0.02) 及び Al(0.00)の酸化物より成る。

** この処理ではベースピークの2%より少ないピークを考慮していないので、平均値は合計 100%とならないであろう。

ルツボを、その内容物と共にT G 50炉中、温度プログラム速度20℃/分に加熱した。この加熱速度は該物質を分析するために標準的であり、かつ十分である。

加熱は、25℃から800℃までは窒素ガス雰囲気中で601℃から 780℃までは空気(酸化剤)雰囲気中で行った。

さらに2分間、温度を最後の温度に保った(780℃の最高温度は、有機及び無機物質の両者が、この温度に到達するまでに分解する故に、選ばれた。)

結 果:

カリシンの分解プロファイルは特徴的である。第16図はカリシンの分解プロファイルの長時間のプロット及び対応する一次微分プロットを示す。アセマンナン(カリシンの活性物質)の分解パターンは、他のポリサッカライドのそれと異っている。例えば、同一の操作条件下で、アセマンナンの主な分解が起こる温度は、セルロース、デキストランまたはアミラン(amylan)のそれと異っている。アセマンナンに関する重量損失は、200~630℃の間に位置する。カリシンの分解の大半は、200~540℃及び600~830℃の間で起こっている。アセマンナン画分は、これら二つの温度領域の寄与により決定される。一方、灰分及び水分は共に約10重量%寄与する。下の第5表は、TGAによるカリシンの繰り返しの分析結果を示す。

この分析法は、定性性ならびに半定量的である。例えば、アセマンナンパーセントは次のようにして決定することが出来る。

$$1. \text{AMパーセント}(\%) = \frac{\text{mg}(200 \sim 630^\circ\text{C}) \times 100}{\text{mg}(\text{サンプル})}$$

または

$$2. \frac{\text{A}}{\text{M}} \text{パーセント}(\%) = \frac{\text{mg}(200 \sim 630^\circ\text{C}) \text{ サンプル} \times 100}{\text{mg}(200 \sim 630^\circ\text{C}) \text{ リファレンス標準}}$$

水分及び灰分含量は、粉末化された薬剤物質において、重要なパラメーターである。これらのパラメーターは、無重量分析法を用い、容易に測定される。

G. 酸加水分解及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるカリシンの糖成分の決定

導 入 部:

ポリサッカライドを、酸または酵素加水分解により、その構成モノマーに加水分解した。2Mのトリフルオロ酢酸(TFA)は、グリコシド結合を加水分解するのに十分強いが、しかし硫酸と異り、十分に穏かでモノマーの糖残基を破壊しないので、加水分解のために選択された。

目 的:

カリシンのアセマンナン画分のモノマーの糖成分を決定することが目的である。

試薬及び薬品:

1. 内部標準としてイノシトール 0.5mg/mlを含有する2M TFA

2. イソプロパノール

機 器:

1. 自動サンプリング採取器HP 79842 A及び自動インジェクターHP 79841Aを備えたHPLCモデル1084B [ヒューレット パッカード社(Hewlett Packard) 製]

2. バイオ・ラド社製示差屈折計モデル1770

サンプルの調製:

秤量紙上にカリシンを正確に2.0mg秤り取り、テフロンで裏打ちされたキャップを持つ、13×100mmの使い捨て培養管に定量的に移した。

内部標準としてイノシトールを 0.5mg/mlを含有する2M TFA 1mlを加えた。

管を加熱ブロック(ハイセル社(Hyco) 製熱ブロック(Thermal Block))中に 120℃で約1時間置いた。

その加水分解物混合物を、乾燥空気中で、乾燥するまで蒸発させた。

その固形分をイソプロパノール1mlに再分散し、乾燥空気中で乾燥するまで蒸発させた。

HPLCカラム中への注入のための準備として、固体を脱イオン水1ml中に溶解した。

HPLC条件:

カラム: Amnec Carbohydrate H P X - 87P [バイオ・ラド社(カリフォルニア州リッチモンド) 製]

移動相: 脱イオン水(80℃にて)

流 速: 0.6ml/分

オープン温度: 40℃

チャートスピード: 0.2cm/分

検出器: Refractive Index (バイオ・ラド社製、
#1770)

減 衰: 2

結 果:

第17図は、グルコース、ガラクトース、マンノースそれぞれ1mg/ml、及び内部標準としてイノシトール 0.5mg/mlを含む標準混合物のクロマトグラムを示す。第18図は、同一条件下のカリシンのクロマトグラムを示す。マンノースがポリマーの主成分であることが認められ、ポリサッカライドが本質的にマンノース糖単位から成ることを示している。

H₂ 気-液クロマトグラフィーによる、カリシンの分離及び定量

導 入 部:

カリシンのポリサッカライドは実際、主として中性である。中性のポリサッカライドは、気-液クロマトグラフィー (GLC) により、そのグリシトールアセテートとして、より良く分析される。

目 的:

本研究の目的は、糖モノマーをそのグリシトールアセテートとして、分離及び定量することによって、カリシンをさらに特徴付けることである。この手法では、グリシトールアセテートはキャピラリーカラムで分離され、炎イ

オン化法により検出される。

試薬及び商品:

1. 内部標準としてイノシトールを 0.2mg/ml 含有する 2 M TFA
2. イソプロパノール
3. 重水素化ホウ素ナトリウム (NaB^2H_4) または水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) を 10mg/ml 含有する 1 M NH_4OH
4. 氷酢酸
5. メタノール
6. ピリジン
7. 無水酢酸
8. トルエン及びジクロルメタン
9. ガスクロマトグラフィー (GLC) 等級アセトン

機 器:

1. ガスクロマトグラフ Vista 6000 (ヴァリアン インスツルメントグループ (Varian Instrument Group, カリフォルニア州パロアルト) 製)
2. 積分計 SP4290 (スペクトラ・フィジクス社 (Spectra-Physics, カリフォルニア州サンジョセ) 製)

サンプルの調製:

サンプル 2 ml を正確に秤り取り、テフロンで裏打ちされたキャップを持つ培養管 (13×100mm) 中に移した。

加水分解:

トリフルオロ酢酸 (TFA, イノシトール 200mg/ml を

含有する 2 M) 500μl を加え、120℃で約1時間加熱 (ハイセル社製 Thermal Block) した。

空気の流の下で TFA を除去し (40℃の水浴)、残分をイソプロパノールで洗浄して残った酸を除去した。

還 元:

残分を、重水素化ホウ素ナトリウム (NaB^2H_4) を 10mg/ml 含有する 1 M NH_4OH (300ml) 中に溶解し、室温で1時間放置した。

氷酢酸 (泡立ちがなくなるまで数滴) で過剰の還元剤を分解し、空気の下で溶媒を除去、残分を酢酸を 10% 含有するメタノール (3×300μl) で洗浄し、最後にメタノール (3×300μl) で洗浄した。

アセチル化:

乾燥した残分に、ピリジン 200μl 及び無水酢酸 200μl を加え、120℃で20分間加熱した。

冷却した溶液にトルエン 500μl を加え、空気の下で溶媒を除去、残分を水に溶解し、ジクロルメタン中に抽出した。

有機層を汚れない管に移し、空気の下で有機溶媒を除去、GLC に先立ち、残分をアセトン (100μl) に溶かしした。

気-液クロマトグラフィー条件 (GLC)

カラム: SP 2330, 15m または 30m, 内径 0.25mm, 液層厚み 0.25μm [スベルコ社 (Supelco, Inc.) 製]

キャリアーガス: ヘリウム

オープン温度: 235℃ (等温)

インジェクション温度: 250℃

注入量: 0.5~1μl (分割)

結 果:

第19図は、ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコース、及びイノシトールの標準混合物をそれらのグリシトールアセテートとしての GLC クロマトグラムを示す。カリシンのクロマトグラムを第20図に示す。図中の主要なピークはマンノースに対応する。ガラクトース、グルコース、アラビノース、キシロース、及びフコースの痕跡が存在する。これらは、細胞壁夾雑物に由来するものである。最後のピークは、内部標準のイノシトールアセテートである。

マンニトールアセテートは、加水分解及びアセチル化された物質における主要な糖のピークであるので、カリシンは本質的にポリマンノースポリサッカライドである。

マンニトールアセテートのピークは、内部標準としてのイノシトールの助力で定量することが出来る。第21図は、概知の重量のアセマンナンに対して、マンノース/イノシトール面積比をプロットすることにより生じた標準カーブを示す。標準カーブを用い、所与のカリシンサンプル中のアセマンナンの量を計算することが出来る。

I. カリシンのガスクロマトグラフィー/マススペクトル、及びグリコシド結合分析

導入部:

ポリサッカライドは、糖単位が互いに結合する仕方によって特徴付けられる。ポリサッカライドの化学的、物理的、及び生物活性は、糖が、ヘキソースの五つの可能な位置のうちのどこに結合するかに依存する。

目的:

本研究の目的は、カリシンポリサッカライドの糖単位が結合する仕方決定することである。

試薬及び薬品:

1. 乾燥ジメチルスルホキシド (DMSO)
2. ナトリウム=ジメチルスルフィニルアニオン (2M)
3. ヨウ化メチル
4. 2M TFA
5. イソプロパノール
6. NH_4OH の50%メタノール溶液、10mg/ml (NaB^2H_4)
7. 水酢酸
8. 10%酢酸メタノール溶液
9. 無水酢酸
10. 炭酸水素ナトリウム
11. ジクロロメタン
12. GC等級のアセトン

機器:

ガスクロマトグラフ/マススペクトロメーター MSD (HP 5970)

(3) ポリサッカライド (DMSO中) にナトリウム=ジメチルスルフィニルアニオン (2M) 250 μl を加え、少なくとも4時間攪拌した (アルゴン下で反応を行わねばならない)。サンプルをアニオン溶液中に終夜放置するのがより好都合であろう。

(4) アニオン溶液を水中で冷却、ヨウ化メチル 200 μl をゆっくりと加え、その溶液を約1時間攪拌した。

(5) この溶液に、約2.5mlの水を加え、過剰のヨウ化メチルをアルゴンで除去した。

(6) この混合物を、13.3 \times 2.1mm (直径) の透析管 [分子量カットオフ12,000~14,000, スペクトル メディカル社 (Spectrum Medical, Inc., カリフォルニア州ロサンジェルス) 製] に移した。

(7) 透析不能な画分を、空気流 (50 $^\circ\text{C}$) 下で濃縮。

(8) 乾燥した残分に2M TFA 250 μl を加え、120 $^\circ\text{C}$ で1時間加熱。

(9) 空気の下でTFAを除き、残分をイソプロパノールで洗浄 (2 \times 250 μl) 。

(10) 残分を、 NaB^2H_4 を10mg/ml含有する NH_4OH 50%アンモニアホメタノール溶液 (250 μl) に溶解し、室温で1時間放置。

(11) 過剰の還元剤を水酢酸 (数滴) で分解し、濃縮して乾燥させ、残分を10%酢酸メタノール溶液で洗浄 (3 \times 250 μl) 。

(12) 乾燥した残分に、無水酢酸 (100 μl) を加え、サン

GLC/MS及びグリコシド結合分析

カリシンの総合的な特徴付けは、ポリマーの結合の分析を包含する。カリシンは、ダルビル (Darvil) 他により記載された [プラント フィジオロジー (Plant Physiology) 62巻 (1978年) 418~422 ページ、引用することにより、その開示をここに含める] 方法によって過メチル化され、マンノースに加水分解され、メチル化されたアルジトールアセテートに転化される。その揮発性の誘導体を、ヒューレット・パッカード社製GC/MSシステムで、スベルコ (Supelco) SP 2330キャピラリーカラム (30m \times 0.25mm内径) にて分析した。マンノースの、メチル化グリシトールアセテートのフラグメンテーションは、電子衝撃 (EI) 法によって成された。部分的にメチル化され、かつ、部分的にアセチル化されたグリシトールとしての、誘導されたカリシンの全イオンクロマトグラム (TIC) を第22図に示す。部分的にアセチル化されたマンニトールのマススペクトルを第23図に示す。

全操作は次の通りである:

- (1) テフロンで裏打ちしたキャップを有する管の中に、サンプル (1mg) を置き、真空オーブ中、50 $^\circ\text{C}$ にて乾燥した。
- (2) サンプルに乾燥DMSO (250 μl) を加え、サンプルが溶解するまで攪拌 (テフロン攪拌棒) した (超音波を役立てても良い)。管をアルゴン (または窒素) で満たした。

アルを120 $^\circ\text{C}$ で3時間加熱。冷却したサンプルに水 (約1.5 ml) を、次に炭酸水素ナトリウムを、泡立ちが止まるまで加えた。誘導体をジクロロメタン中に抽出。

(13) 有機層を濃縮して乾燥し、GLC及びGLC/MSに先立ち、残分をアセトン 100 μl 中に溶解。

GLC条件:

カラム: SP 2330 溶解シリカカラム (30m \times 0.25mm)
温度: 170 $^\circ\text{C}$ で3分間、次に4 $^\circ\text{C}$ /分で昇温し、240 $^\circ\text{C}$ で10分間保持

検出器: FID

GLC/MS条件:

カラム: SP 2330 (30m \times 0.25mm)
温度: 80 $^\circ\text{C}$ で2分間、170 $^\circ\text{C}$ までは30 $^\circ\text{C}$ /分で、次に240 $^\circ\text{C}$ に4 $^\circ\text{C}$ /分で上昇させ、10分間保持

MS: ヒューレット パッカード社製 MSD

メチル化分析による、サンプルの主要なグリコシド結合の決定

この操作において、ポリサッカライドの全ての遊離ヒドロキシル基を、メチルエーテルに転化する (段階4)。メチル化したポリサッカライドを構成成分モノサッカライドに加水分解し (段階8)、メチル化されたアルジトールへと転化し (段階9) アセチル化する (段階10)。これらの揮発性の誘導体をGLC/MSで分析し (段階13) そのフラグメンテーションパターンから、アリジトール上のO-メチル及びO-アセチル基の位置が決定される。

図

1 及び 4 位を通して結合しているグリコシル（マンノシル）残分〔すなわち（1-4）-結合したマンナン〕を考慮せよ。2、3 及び 6 位のヒドロキシル基は遊離であり、メチルエーテルに転化されることが出来る。

加水分解及び還元すると、1、4 及び 5 位のヒドロキシル基は露出され、アセチル化されて誘導体 1,4,5-トリ-O-アセチル-2,3,6-トリ-O-メチルヘキシトール（第24図）を生じることができる。マススペクトルの手法による試験の原には、主要な第一のフラグメントイオンは、隣り合ったO-メチル基^{1,4,5}、O-メチルとまたO-アセチル基の間の開裂によって作られる。第二のフラグメントイオンは、酢酸、メタノール等の損失により作られる（第25図）。第22及び23図はそれぞれ、カリシンの全イオンクロマトグラム、及び一部分的アセチル化したマンニトールとしての4-結合したマンナンのマススペクトルを示す。

カリシンの全イオンクロマトグラム（TIC）及び結合分析に基き、カリシンは主としてマンノースの（1-4）-結合した線形ポリマーであると推定される。

実施例 6

32才の患者は“多年の間”潰瘍性大腸炎の履歴を持っていた。活発な症状の発現の間、彼女は40mgのプレドニソン（prednisone）、3gのアサルフィジン（Asulfidine）、50mgの6-メルカプトプリンおよびフラジル（Flagyl）からなる日々の処方に対して応答しなかった。彼女は腹部の

痛みを継続して有し、1日に4〜8回血便があった。彼女は点滴を受けた。内視鏡の診断では、軽やかな肝臓ないし横断潰瘍を伴う重い進行する結腸潰瘍を示した。この患者は、彼女の他の医薬に加えて1日4回50mgのカリシンを投与され、家に帰された。1週間で彼女の症状は実質になくなった。この患者は現在この時間において単独の薬物としてカリシンを継続している。身体検査および症状は、全て正常であると記録されている。

潰瘍性大腸炎とクローン病（Crohn's disease）に同様の応答を示す5つの別のケースが認められた。一人の患者は、カリシンのカプセルを切らした。4週間で軽い症状が再発し始めた（軽やかな腹部の不快感を伴った排便が増えた。）そして彼女は薬物の投与を再開した。3日で彼女は全体として正常な排便症状に戻った。

実施例 7

多数のエイズの患者が、毒性または副作用を伴うことなく長期間カリシンの大量投与を受けた。これらのエイズ患者には、臨床症状の軽減および消滅ならびに感染の機会の減少を伴って、T・4およびT・8リンパ球の比の上昇およびT・4の絶対数の上昇が認められた。カリシンは患者において抗ウイルスもしくは免疫調節効果を有することが示唆される。

これらの患者のリンパ球に対する刺激が観察された。このことはカリシンが免疫調節に関与しているかもしれないことを示唆する。

実施例 8

カリシンの収率に及ぼすアルコール濃度の影響

操 作：

ヒルトップの葉（15.9ポンド）を洗い、フィレット化し、ワーリングブレンダーで粉砕し、次いで8層の綿布で濾過した。次にこのゲルを4個の11クオートステンレススチール製パンに移し、冷たいUSPグレードのエチルアルコールをそれぞれに容量比で2：1、3：1、4：1、および5：1の割合で加えた。その量は以下のように要約することができる：

比（エタノール ：アロエゲル	エチル ゲルの量	アルコールの量
2：1	500ml	1000ml
3：1	500ml	1500ml
4：1	1670ml	6680ml
5：1	500ml	2500ml

析出物を4時間沈降させ、次いで残存するアルコール-ゲル溶液を注意深くデカントし、別の容器に蓄えた。この析出物をIECセントラ-7遠心分離機を用いて2800rpmで10分間遠心分離し、アルコールで洗浄し、次いで同じ条件で再び遠心分離した。ペレットを600mlのジャーに移し、液体窒素で凍結し、1晩凍結乾燥した。

2：1の比からの上澄み液に追加のアルコールを加え、室温で1晩沈降させた。残存する上澄み液も室温で放置し

1晩沈降させた。

翌日に、追加のアルコールで析出された2：1の比からのペレットを除き、先に述べたように上澄み液から析出物を集めた。この場合、ペレットを凍結乾燥ジャーに移す際に約5〜10mlの水を加えた。

結果：はじめの4時間のアルコール析出の結果は、次のように要約することができる：

比（エタノール ：アロエゲル	収量（g）	収率％（カリシン g/gゲル）
2：1	0.0518	0.010
3：1	0.3847	0.077
4：1	1.945	0.116
5：1	0.6675	0.134

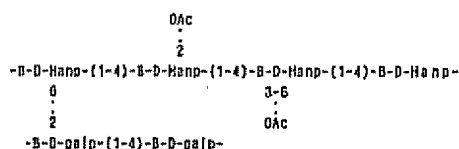
さらにエチルアルコールを加えた後、2：1の上澄み液はさらに178mgのカリシンを生成した。1晩沈降させるだけにより、3：1および4：1の比の上澄み液は、それぞれさらに89mgおよび105mgを生成した。5：1の比は、最初に単離の後、ほとんど沈降を生成しなかった。従って再操業はしなかった。

2：1の比からの2回目の析出（3：1の場合に、凍結乾燥する前に5〜10mlの水を用いて遠心バケットを濯いだ。これは、他のサンプルが生成した密度の高い灰色のカリシンサンプルとは著しく異なる低密度の白色のふわふわしたカリシンを生成した。

要 約

カリシンはアロエ ベア 枯液から抽出された、精製され

た白色無定形粉末である。そのポリマーは本質的に線状B(1-4)-D-マンノシル単位からできている。それは、酸素原子を介してポリマーに結合したアセチル基を不規則に散在させた、長鎖のポリマーである。アセチル化の程度はアルカリ性ヒドロキサム酸塩法(alkaline hydroxamate method)〔ヘストリン, S.: *J. Biol. Chem.*, 180: 240(1949)この開示はこれにより参考としてここで具体的に組み込まれる。〕により測定されたときに約0.8アセチル基/モノマーである。中性糖結合の分析では、D-ガラクトピラノース残基が各70個の糖ごとに約1個の比で、おそらく(2-6)結合を介して鎖に結合していることを示している。マンノースのガラクトースに対する比が20:1であることは、ガラクトース単位がまた主としてB(1-4)グリコシド結合により互いに結合していることを示している。ポリサッカライドの特性化の現在の技法を用いることによって明らかにされた化学構造は以下のようである:



リシンのO-アセチル化が粘度に影響を及ぼすことを示している。脱アセチル化の生成物は水には溶けず、これは明らかに、増加した強い水素結合のためである。

(b) 赤外線スペクトル:

カリシンの官能基は赤外線スペクトルにより同定した(第14図および第15図)。1740 cm^{-1} および1250 cm^{-1} 付近の強いIR吸収帯はアセチル化を表す。約3422 cm^{-1} , 1066 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} , 897 cm^{-1} , 806 cm^{-1} および773 cm^{-1} に位置する他の吸収はB-マンノシル結合を有するポリサッカライドの特徴的な吸収である。弱いアミドIおよびアミドIIの吸収がそれぞれ約1649 cm^{-1} および1541 cm^{-1} に位置し(第14図)、これらはタンパク質の不純物に由来するものである。というのは、カリシンをプロテアーゼで処理し、透析すると、これらのピークが無い(第15図)からである。

(f) 分子量分布:

カリシンは、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定したとき、10,000ダルトンより大きい物質の少なくとも73%で多分散されている。高圧液体クロマトグラムの1例(第13図)は、A, BおよびCと符号を付した3つの画分を示している。ピークAは100,000ダルトンより大きいカリシンを表し、そしてピークBは10,000ダルトンより小さいが、100,000ダルトンより小さいカリシンを表す。ピークCはカリシンの分子量成分を表す。ピークBおよびCの面積はカリシンが分解すると増加し、そしてこのことはピークAの面積の減少を引き起こす。

カリシンは、10,000ダルトンより大きい分子量を有する物質の少なくとも70%で多分散されている。

物理的および化学的特性:

(a) 溶解性:

カリシンは白ないしオフ・ホワイトの無定形粉末であり、水にゆっくりと溶解して高粘度のコロイド溶液(0.4%w/v)になる。数時間勢いよく振りまぜると1%(w/v)の粘稠なゲルが得られる。カリシンはアロピレングリコールを含む一般的な有機溶媒には事実上溶解しない。しかし、水20%およびアロピレングリコール80%には溶解して、いつまでも安定なままであるなめらかで粘稠なゲルになる。

(b) pH:

0.2%(w/v)のカリシン水溶液は約6.31 \pm 0.33のpHを有する。

(c) 旋光性:

0.45 μm のメンブランフィルター〔ユニフロ(商標: Uniflo), ニューハンプシャー州キーンのシュライシャー&シュル社(Schleicher & Schuell Inc., Keene, NH)〕を通過させることにより透明化したカリシンの0.2%(w/v)水性溶液の比旋光度は:

$[\alpha]_{589}^{20} = -20$ であり、これはB-結合を表している。脱イオン水をブランクとして用いた。

(d) アルカリ処理:

カリシンのアルカリ処理により、粘液性ゼリーを形成する能力を破壊する脱アセチル化が起こり、このことはカ

この技術分野の者には、本発明の広い教示および例示的な実施例から、好ましい列挙した化学品およびプロセス工程を、ここで挙げなかった化学品および工程で置き換える可能性があることが容易に明らかとなる。そのような挙げなかった化学品および工程への普及がなくとも、それらが本発明の範囲内にあることを示すわけではなく、この教示が簡潔および正確であることが必要であるという理由のみに基づき省略されている。

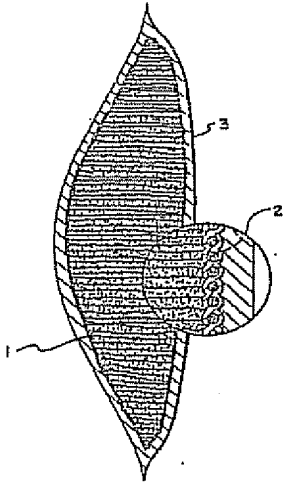


FIG. 1

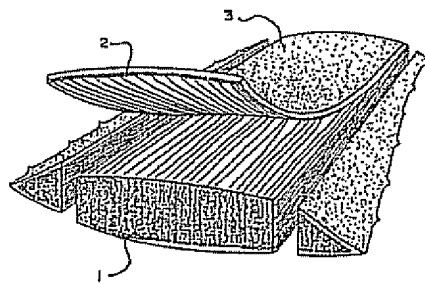


FIG. 2

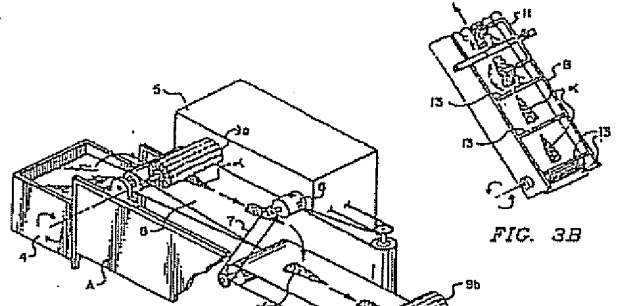


FIG. 3A

FIG. 3B

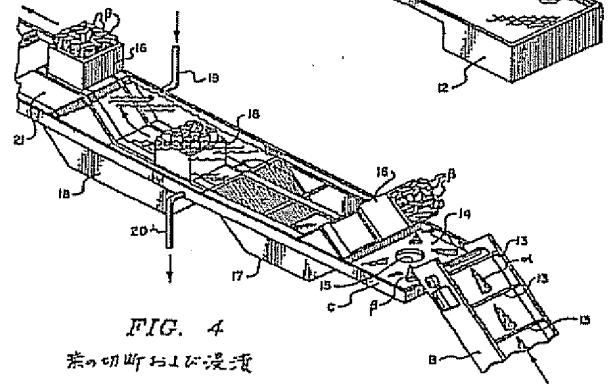


FIG. 4

蒸気切断機に浸漬

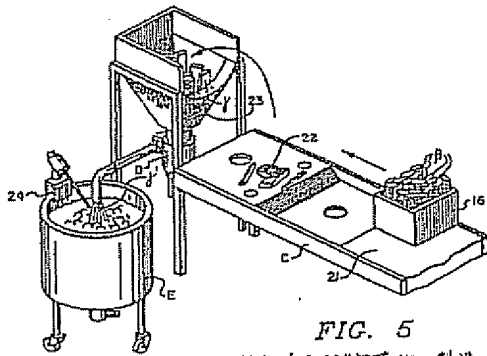


FIG. 5

フィレットおよび粗研削の製造

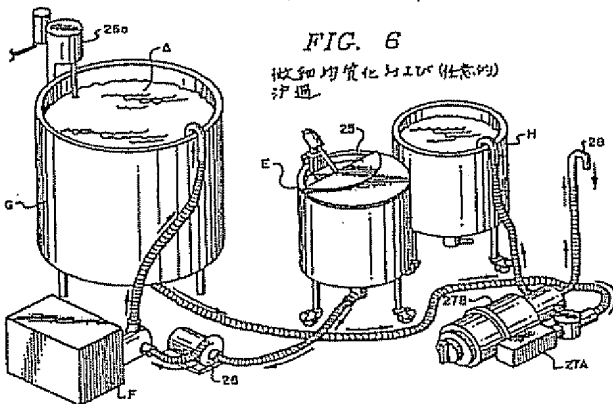


FIG. 6

微細均質化および（任意の）
汁通

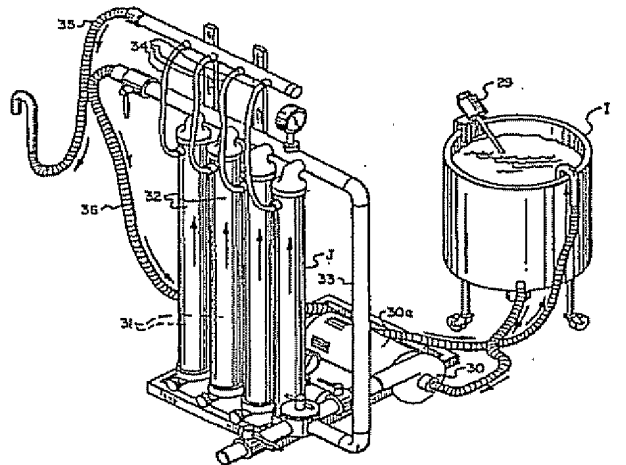


FIG. 7

造析装置

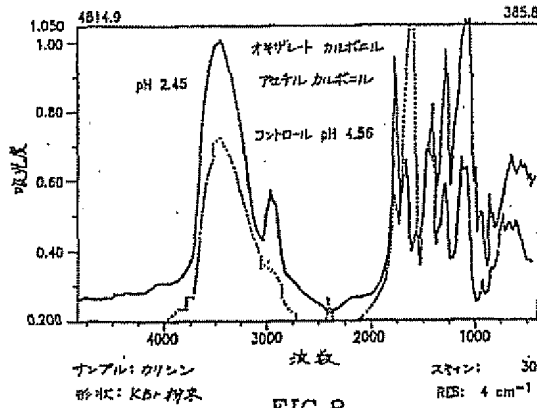


FIG. 8

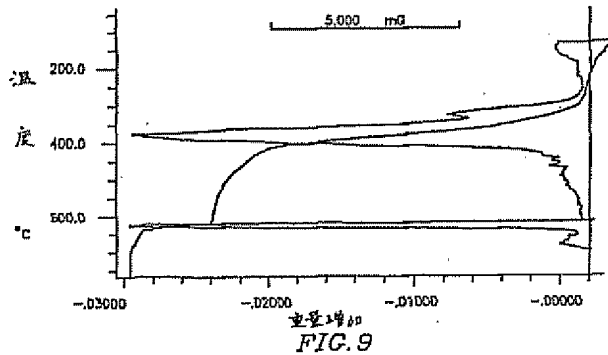


FIG. 9

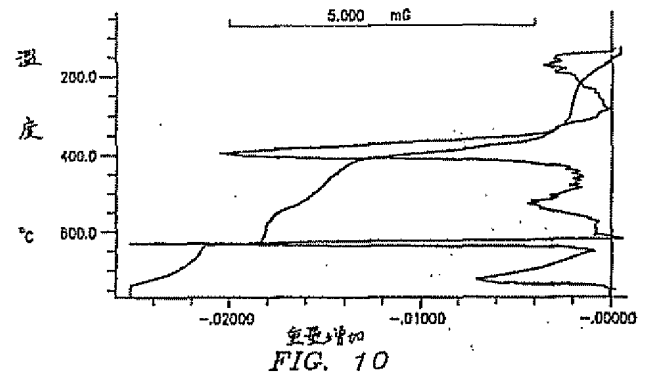


FIG. 10

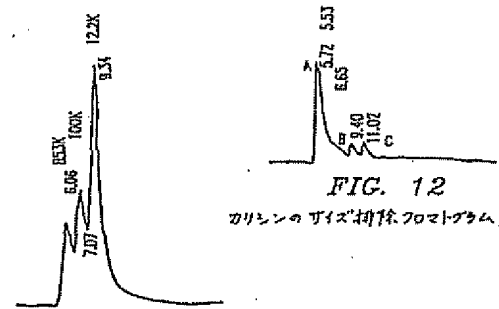


FIG. 11

フルクテン線増加のサイズ・HPLCクロマトグラム

FIG. 12
カリシンのサイズ排除クロマトグラム

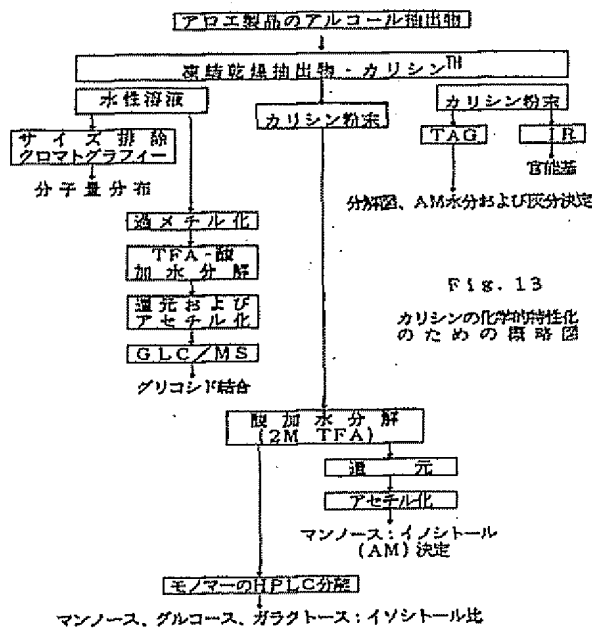


FIG. 13

カリシニンの化学的 특성化のための概略図

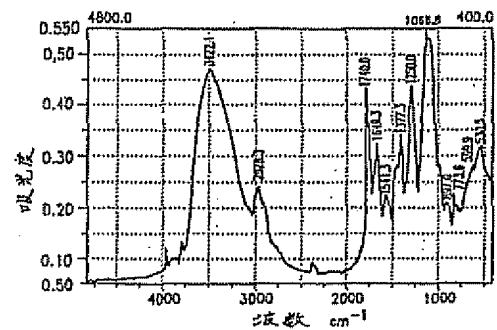


FIG. 14

プロテアゼ処理していないカリシンのIRスペクトル

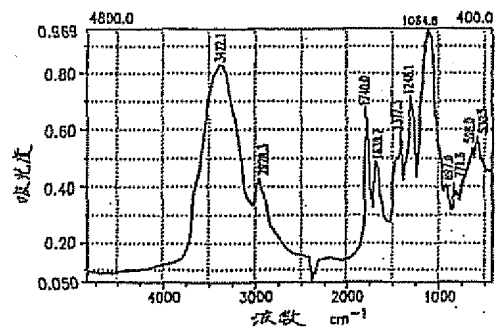


FIG. 15

プロテアゼ処理したカリシンのIRスペクトル

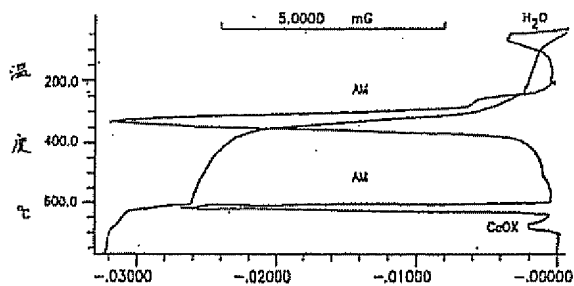


FIG. 16 温度依存性
カリシンのTGA温度依存性

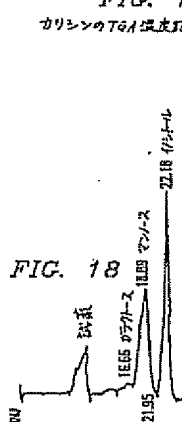
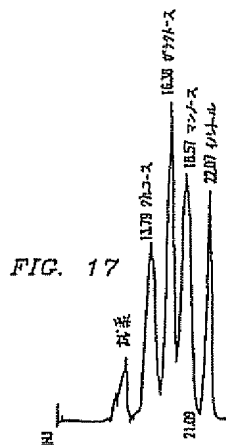


FIG. 18



第1頁の続き

⑤Int. Cl. *

A 61 K 7/42
35/78

識別記号

庁内整理番号

6971-4C

ABF
ACA
ACL
ACQ
ADT
ADZ

V

8413-4C